

Immunoaffinitets-MS som nytt anti-dopingverktøy

Bestemmelse av hCG i urin og serum

Ann Helene Snilsberg



Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2012

Immunoaffinitets-MS som nytt anti-dopingverktøy

Bestemmelse av hCG i urin og serum

Ann Helene Snilsberg

Masteroppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo
i perioden februar 2011 til mai 2012

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo
Stipendiat Hanne Lund, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo
Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

©Ann Helene Snilsberg

2012

Immunoaffinitets-MS som nytt anti-dopingverktøy

Ann Helene Snilsberg

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Først og fremst en stor takk til de 25 spreke gutta som sporty stilte opp og donerte litt av seg selv. Uten dere hadde det ikke blitt noen master! Takk til bioingeniørene, sykepleierne og legen på Aker, og Siri, Hilde og Camilla i fjerde etasje på FI som hjalp oss med å gjennomføre prøveinnsamlingen.

Så en stor takk til mine tre dyktige og alltid positive veiledere; Hanne, Trine og Leon. Takk for alle konstruktive tilbakemeldinger, støtte og hjelp. En spesiell takk til Hanne som tross mammapermisjon har vært svært tilgjengelig for å svare på alle mulige spørsmål. Det har jeg satt veldig stor pris på!

Til alle på avdelingen for legemiddelanalyse; takk for god hjelp, inspirasjon og et knakende godt og inkluderende miljø!

Takk til gjengen på kontoret for et hyggelig og sosialt år! Kan fortsatt ikke begripe at vi var de seks heldige som fikk skrive master på legemiddelanalyse.

Til slutt en stor takk til venner og familie for utallige kaffepauser, solpauser, rusleturer, filmkvelder, rekreasjonshelger og oppmuntrende ord. Dere har gitt mange lyspunkter til masterhverdagen.

Oslo, mai 2012

Ann Helene Snilsberg

Innholdsfortegnelse

FORORD.....	4
INNOLDSFORTEGNELSE.....	5
1. SAMMENDRAG	8
2. FORKORTELSER OG BEGREP	9
3. INNLEDNING	11
3.1 HENSIKT	12
4. TEORI.....	13
4.1 AMINOSYRER, PEPTIDER OG PROTEINER	13
4.2 HCG	13
4.2.1 Struktur.....	14
4.2.2 hCG-isoformer	15
4.2.3 Biologisk forekomst og funksjon	17
4.2.4 Metabolisme	18
4.3 DOPING.....	19
4.3.1 Avgivelse og analyse av dopingprøver.....	20
4.3.2 Regulering av endogen testosteronproduksjon	20
4.3.3 Anabole androgene steroider.....	21
4.3.4 hCG i doping.....	22
4.3.5 hCG-preparater.....	23
4.4 BIOLOGISKE MATRIKS	24
4.4.1 Urin	24
4.4.2 Serum.....	25
4.5 DETEKSJON AV HCG I DAG	25
4.5.1 Prinsippet	26
4.5.2 Utfordringer	26
4.6 IMMUNOAFFINITETS-MS	27
4.6.1 Prøveopparbeidelse.....	28
4.6.2 LC-MS	32

5. MATERIALER	37
5.1 KJEMIKALIER, PROTEINER OG UTSTYR	37
5.2 TILLAGING AV LØSNINGER	41
5.2.1 Løsninger til immunoekstraksjon	42
5.2.2 Løsninger til trypsinering	42
5.2.3 Løsninger til SPE	43
5.2.4 Løsninger til tillaging av intern standard	43
5.2.5 Mobilfaser	44
5.3 TILLAGING AV UTSTYR	44
6. METODER	45
6.1 STUDIEN	45
6.1.1 Deltakere, studiedesign, intervensjon og prøveinnsamling	45
6.1.2 Håndtering av prøvene etter prøvetakning og oppbevaring	46
6.2 IMMUNOAFFINITETS-MS-METODE	47
6.3 PRØVEOPPARBEIDELSE	47
6.3.1 Klargjøring av dopingprøver før analysestart	48
6.3.2 Immunoekstraksjon med magnetiske kuler	48
6.3.3 Trypsinering	49
6.3.4 SPE	49
6.4 INTERN STANDARD	50
6.5 ANALYSE AV HCG	50
6.5.1 Oppsett av LC-MS/MS	50
6.5.2 HPLC	51
6.5.3 MS	52
6.5.4 Standardkurve og QC-prøver	54
6.6 STATISTISKE BEREKNINGER	55
7. RESULTATER OG DISKUSJON	56
7.1 DELTAKERE	56
7.2 ANALYSE AV STUDIEPRØVER	57
7.2.1 Utskillelsesprofiler	59
7.2.2 Nullprøve; blank serum og urin	65
7.2.3 Kinetiske betraktninger	65

7.2.4 Er det mulig å skille mellom uhCG (Pregnyl®) og rhCG (Ovitrelle®)?	70
7.2.5 Hvilken matriks egner seg best for deteksjon av hCG i doping?	72
7.2.6 Kan metoden skille mellom kreft og doping?	72
7.2.7 Immunoassays eller immunoaffinitets-MS i fremtidens dopingarbeid?	73
7.3 FEILKILDER	73
8. KONKLUSJON.....	75
9. KILDELISTE	76

VEDLEGG

VEDLEGG 1: GODKJENNING FRA REGIONAL ETISK KOMITÉ (REK)

VEDLEGG 2: INFORMASJONSSKRIV TIL DELTAKERNE

VEDLEGG 3: SAMTYKKEERKLÆRING

VEDLEGG 4: INFORMASJON OM DELTAKERE OG INDIVIDUELLE UTSKILLELSESPROFILER

1. Sammendrag

hCG er et endogent glykoprotein hormon som kan detekteres i urin og blod hos gravide kvinner samt i forbindelse med visse former for kreft. hCG stimulerer til progesteronproduksjon i eggstokkene hos kvinner og testosteronproduksjon i testiklene hos menn. Ved siden av bruk i diagnostikk, står hCG også oppført på WADAs dopingliste for menn. Ved misbruk av anabole androgene steroider (AAS) reduseres endogen testosteronproduksjon. Injeksjon av hCG i løpet av en steroidsyklus øker endogen testosteronproduksjon og reduseres graden av AAS-bivirkninger. hCG er ikke vist å ha positiv effekt hos kvinner.

Hensikten med oppgaven var å verifisere at immunoaffinitets-MS-metoden utviklet av Hanne Lund *et al.* [1-5] kan brukes til deteksjon av ulovlig injisert hCG for på sikt å kunne implementeres i WADAs antidopingarbeid. En studie med 25 friske frivillige menn ble gjennomført. Gruppen ble delt i to hvor hver halvdel fikk et av to hCG-preparater, Pregnyl® eller Ovitrelle®. Pregnyl® inneholder endogent hCG ekstrahert fra urin fra gravide kvinner, mens Ovitrelle® inneholder rekombinant hCG. Det ble samlet inn 10 urinprøver og 7 blodprøver fra hver deltaker. Prøvene ble opparbeidet ved bruk av magnetiske kuler coatet med et hCG-spesifikt antistoff. Etter redusering, alkylering, tryptisk klipp og SPE, ble prøven analysert med LC-MS/MS i SRM-mode.

24 av 25 deltakere fullførte studien. 237 av 240 urinprøver og 167 av 168 serumprøver ble samlet inn og analysert. Resultatene viste at denne metoden med sikkerhet kan detektere hCG i minst 7 dager i serum og i minst 10 dager i urin. Det var ikke mulig å skille mellom Pregnyl® eller Ovitrelle® ved analyse av serumprøvene, men deteksjon av degraderte hCG-varianter i enkelte urinprøver indikerte injeksjon av Pregnyl®. Metoden kan ikke skille mellom endogent produsert hCG (eks. kreft) og tilført hCG (doping). Utøvere som tester positiv må derfor fremdeles henvises til klinisk kontroll før de kan dømmes for brudd på dopingbestemmelsene. Metoden egner seg godt til deteksjon av hCG i både urin og serum, og bør på sikt implementeres i WADAs analyserutiner som bekreftelsesmetode når hCG er påvist i screeninganalyser ved bruk av immunoassays.

Denne studien er sponset av WADA

2. Forkortelser og begrep

AAS	Anabole androgene steroider
ABC	Ammoniumbikarbonat
ACN	Acetonitril
β T5	Signaturpeptid som representerer β -subenheten av hCG
Da	Dalton – enhet for molekylvekt
DTT	Ditiotretiol – reduksjonsreagens
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay – enzymkoblet immunoassay
ESI	Elektrosprayionisering
FSH	Follikelstimulerende hormon
G	Sentrifugeringseffekt – også kalt Relative Centrifugal Force (RCF)
GTD	Gestational trophoblastic disease – svangerskapsrelatert sykdom
hCG	Humant koriongonadotropin
hCG α	α -subenheten av hCG
hCG β	β -subenheten av hCG
hCG β cf	hCG β -core fragment
hCG β n44/45	Nicked variant av hCG β – peptidkjede spaltet mellom aminosyre 44 og 45
hCG β n47/48	Nicked variant av hCG β – peptidkjede spaltet mellom aminosyre 47 og 48
hCG _h	Hyperglykosylert hCG – hCG med større sukkergrupper enn vanlig hCG
HCOOH	Maursyre
HPLC	High-performance liquid chromatography – væskekromatografi
IAA	Iodoacetic acid – jodeddiksyre – alkyleringsreagens
IE	Internasjonale enheter (mål for biologisk respons)
IS	Intern standard
is β T5	Intern standard for signaturpeptid β T5
LC	Væskekromatografi – forkortelse for HPLC
LH	Luteiniserende hormon
LLOQ	Lower limit of quantification – minste kvantifiserbare mengde

LOD	Limit of detection – deteksjonsgrense
MFA	Mobilfase A
MFB	Mobilfase B
MFC	Mobilfase C
MFD	Mobilfase D
MS	Massespektrometri
MS/MS	Tandem massespektrometri – to masseanalysatorer etter hverandre
m/z	Masse-ladningsforhold
Nicked	Spaltet peptidbinding
PBS	Phosphate buffered saline – fosfatbuffer
QqQ	Trippelkvadrupol
REK	Regional Etisk Komité
RIA	Radioimmunoassay
rhCG	Rekombinant humant koriongonadotropin – hCG-varianten i Ovitrelle®
rpm	Revolutions per minute – spinn per minutt
SE	Standardfeil – standardavviket til gjennomsnittet
Spike	Tilsette – brukt om å tilsette hCG til urin eller serum i denne oppgaven
SPE	Solid phase extraction – fast-fase ekstraksjon
SRM	Selected reaction monitoring
$t_{1/2}$	Halveringstid
TFA	Trifluoreddiksyre
TIC	Total ion count
TSH	Tyreoidestimulerende hormon
Tris	Tris-buffer
uhCG	hCG ekstrahert ut av urin fra gravide – hCG-varianten i Pregnyl®
WADA	World Anti-Doping Agency

3. Innledning

Humant koriongonadotropin (hCG) er et endogent glykoprotein hormon som normalt produseres av trofoblastceller i placenta under svangerskap [6, 7]. I tillegg til å stimulere eggstokkene til økt progesteronsekresjon, har hCG også effekt på vekst og differensiering av livmor, placenta og foster gjennom svangerskapet. Hos menn stimulerer hCG testiklene til økt testosteronproduksjon. hCG er også en biomarkør i forbindelse med ulike former for kreft [8].

hCG brukes ofte som en fellesbetegnelse på en gruppe molekyler (isoformer) med samme proteingrunnstruktur, men ulik grad av glykosylering og brudd i proteinstrukturen, såkalt nicking [6]. Forekomst av ulike isoformer er forbundet med ulike perioder av svangerskap og ulike kreftsykdommer.

hCG utviser stor strukturlikhet med et annet glykoprotein hormon, luteiniserende hormon (LH), og hCG og LH virker derfor på de samme reseptorene [9]. Ved å injisere hCG kan dette utnyttes hos menn for å øke testosteronproduksjon og muskelmasse [10]. I tillegg benyttes hCG i forbindelse med anabole androgene steroider (AAS) for å øke den endogene testosteronproduksjonen som misbruk av AAS har redusert. hCG står derfor oppført på World Anti-Doping Agencys (WADA) liste over stoffer som er forbudt for menn å bruke både i og utenfor konkurranse [11].

Påvisning av hCG i urin og serum gjøres i dag ved bruk av immunometriske metoder som baserer seg på monoklonale antistoffers selektive interaksjoner med epitoper på hCG-molekylene [12, 13]. Tross selektive egenskaper er det flere ganger vist at dagens immunometriske metoder kan føre til falsk positive og negative resultater som igjen kan få store konsekvenser i cancerdiagnostikk så vel som i doping [14].

For å påvise hCG i forbindelse med doping krever WADA deteksjon med to ulike immunoassays som hver har LOD på minst 5 IE/L [15]. Ved analyse av dopingprøver er det ønskelig med sensitive og selektive metoder. Det er allerede utviklet en immunoaffinitets-MS-metode for analyse av hCG i doping, men denne metoden skiller ikke mellom ulike isoformer, og er heller ikke blitt implementert hos WADA [16]. Stipendiat Hanne Lund ved Universitetet i Oslo har i samarbeid med tre masterstudenter utviklet, optimalisert og validert en ny immunoaffinitets-MS-metode til bruk i både dopinganalyse og cancerdiagnostikk [1-5]. Metoden detekterer og differensierer mellom hCG α , hCG β , to nickede varianter og hCG β cf.

3.1 Hensikt

Målet med denne oppgaven var å teste om immunoaffinitets-MS-metoden utviklet, optimalisert og validert av Hanne Lund *et al.* egner seg til deteksjon av ulovlig injisert hCG i forbindelse med doping. Det ble gjennomført en studie med 25 friske frivillige menn. Gruppen ble delt i to hvor hver halvdel fikk enten rekombinant hCG (Ovitrelle[®]) eller hCG ekstrahert fra gravide kvinners urin (Pregnyl[®]). Det ble tatt blod- og urinprøver over et tidsintervall på 14 dager, og disse prøvene ble analysert ved hjelp av den nye immunoaffinitets-MS-metoden.

Delmål:

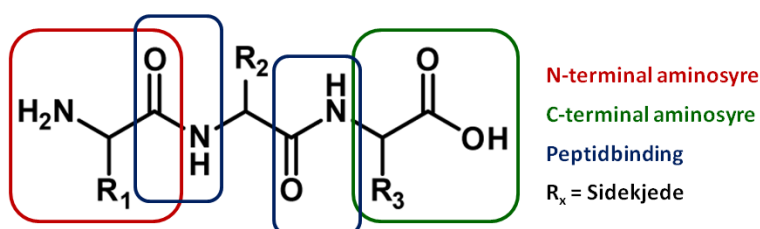
- Gjennomføre studien; rekruttere deltagere og samle inne prøvemateriale.
- Vise at immunoaffinitets-MS-metoden kan benyttes til å detektere ulovlig injisert hCG.
- Kvantifisere hCG i urin og serum ved hjelp av intern standard og standardkurver.
- Vise *hvor lenge* det er mulig å påvise intakt hCG og isoformer i urin og serum.
- Sammenligne tilstedeværelsen av ulike hCG-isoformer i urin og serum.
- Sammenligne Pregnyl[®] og Ovitrelle[®] med hensyn på tilstedeværelsen av ulike hCG-isoformer.

4. Teori

4.1 Aminosyrer, peptider og proteiner

Proteiner er en gruppe makromolekyler med stor diversitet og mange ulike funksjoner. Hormoner, antistoffer, inflammasjonsmediatorer, og enzymer er bare noen eksempler på grupper av proteiner med ulike oppgaver i kroppen [17].

Proteiner er bygget opp av aminosyrer. Aminosyrer er organiske syrer bestående av en karboksylsyre, en aminogruppe og en R-gruppe som avgjør aminosyrens unike egenskaper (figur 4-1).



Figur 4-1: Generell peptidstruktur.

Det finnes 22 aminosyrer i naturen; 2 har negativ sidekjede, 3 har positiv sidekjede og 17 har nøytrale (polare eller upolare) sidekjeder. To aminosyrer kobles sammen gjennom en kovalent peptidbinding mellom karboksylsyren og aminet til et peptid. Flere aminosyrer satt sammen på denne måten kalles polypeptider eller proteiner.

Det er de kjemiske egenskapene til sidekjedene og rekkefølgen av aminosyrene i proteinet som avgjør hva slags struktur og egenskaper proteiner innehar. Peptidkjeden foldes sammen i en gitt konformasjon ved at R-gruppen og peptidryggraden danner svake ikke-kovalente bindinger som van der Waals-krefter, hydrogenbindinger og ioniske interaksjoner med hverandre. Peptidkjeden foldes sammen i den konformasjonen som gir lavest energi. Et gitt protein har én bestemt konformasjon [17, 18].

4.2 hCG

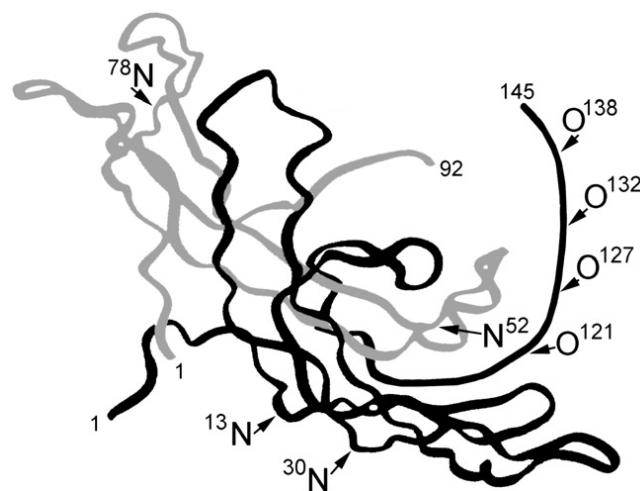
Humant koriongonadotropin (hCG) er et proteinhormon som først ble kjent på begynnelsen av 1920-tallet da forskere demonstrerte sammenhengen mellom placenta og

progesteronproduksjonen i corpus luteum [19]. På 1970-tallet ble peptidstrukturen til hCG bestemt og bekreftet av to ulike forskergrupper [20, 21] og siden den gang har det blitt utført betydelig forskning for å kartlegge biologisk forekomst, variasjon og funksjon [6].

4.2.1 Struktur

Humant koriongonadotropin (hCG) er et endogent glykoprotein hormon som naturlig produseres av trofoblastceller i placenta under svangerskap. Glykoprotein hormonfamilien har tre medlemmer foruten hCG; follikelstimulerende hormon (FSH), luteiniserende hormon (LH) og tyreostimulerende hormon (TSH) [7, 19]. Glykoprotein hormoner er heterodimere. De består av en felles α -subenhet og en spesifikk β -subenhet som holdes sammen av ikke-kovalente hydrofobe og ioniske interaksjoner [9]. α -subenheten inneholder 92 aminosyrer og veier ca. 14.000 Da, mens den hCG-spesifikke β -subenheten (hCG β) inneholder 145 aminosyrer og veier ca. 23.500 Da. Total molekylvekt for hCG er ca. 37.500 Da [7]. hCG inneholder elleve disulfidbindinger; fem er lokalisert på hCG α og seks er lokalisert på hCG β [22].

Glykoproteiner er store molekyler bestående av en proteingrunnstruktur med suktermolekyler kovalent bundet til enkelte aminosyreenheter [17]. hCG har åtte oligosakkarider kovalent bundet til proteinstrukturen. Foruten å vise krystallstrukturen til hCG, viser figur 4-2 [6] hvordan to oligosakkarider er N-bundet til hCG α og to er N-bundet til hCG β . I tillegg er fire oligosakkarider O-bundet til hCG β . Sukkergruppene utgjør om lag 1/3 av den totale molekylvekten til hCG [7].

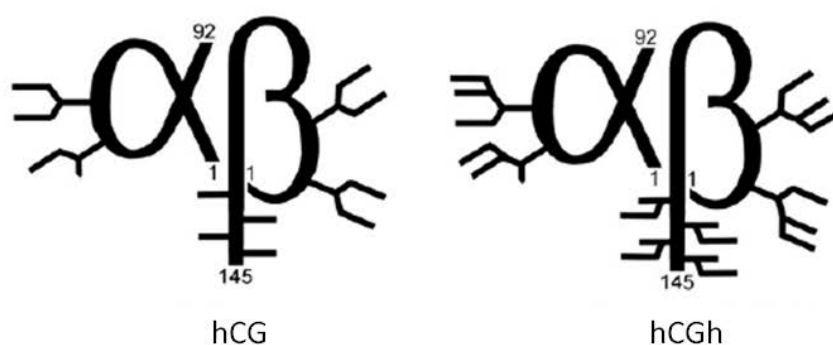


Figur 4-2: Krystallstruktur av hCG. hCG α er indikert med lys grå farge, mens hCG β er svart. Tallene representerer aminosyrenummer i peptidkjeden. O og N representerer henholdsvis hvor O-bundet og N-bundet sukkergrupper er bundet til peptidkjeden [6].

4.2.2 hCG-isoformer

hCG brukes ofte som en fellesbetegnelse om en gruppe molekyler med samme peptidgrunnstruktur, men med ulike grad av glykosylering, kløyvinger i peptidkjeden og biologisk funksjon [23]. De ulike molekylerne omtales ofte som isoformer av hCG.

I begynnelsen av svangerskap og i forbindelse med visse kreftformer dannes en variant av hCG med større og mer forgrenede sukkergrupper. Denne varianten kalles hyperglykosylert hCG og benevnes hCGh. Molekylvekten av hCGh kan være opp mot 41.000 Da [19]. Figur 4-3 gir et grafisk inntrykk av forskjellen på hCG og hCGh [6].



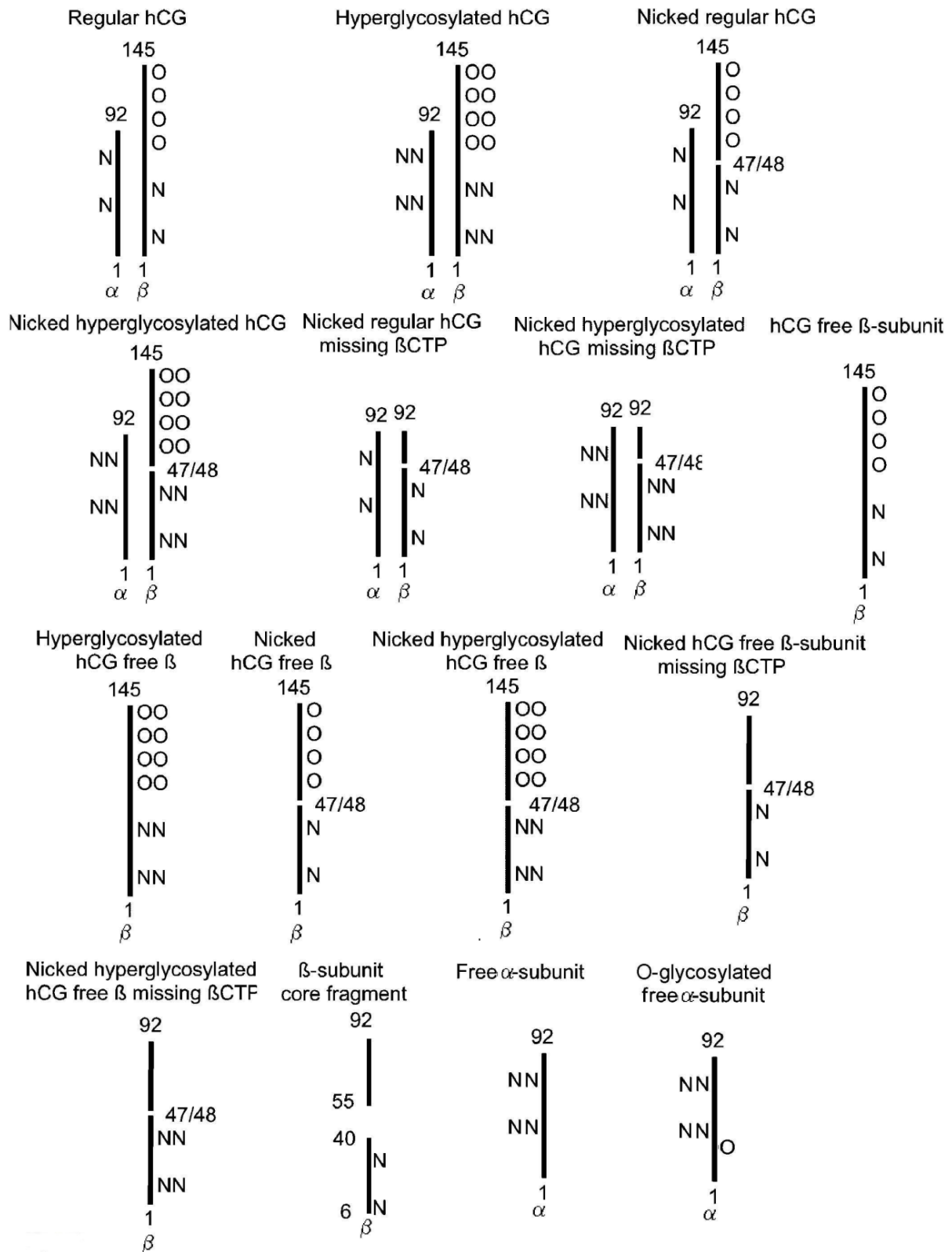
Figur 4-3: Forskjell på vanlig hCG og hyperglykosylert hCG (hCGh). Sukkermolekylene er representert med rette og forgrenede streker ut fra α - og β -subenhet [6].

Intakt hCG kan dissosiere fra hverandre og opptre som frie subenheter, hCG α og hCG β [4, 7, 19]. Dissosiasjon forekommer også hos hCGh og det dannes fritt hyperglykosylert hCG β .

Leukocyt elastase-liknende protease er et proteolytisk enzym som kan kløyve peptidkjeden til hCG β på ulike steder mellom aminosyre 44 og 48, og mellom aminosyre 92 og 93 [19, 24]. Dette resulterer i ulike former av såkalte nickede varianter med og uten C-terminalt peptid (CTP). Nicked hCG kan forekomme både som heterodimer (hCGn) og som fri subenhet (hCG β n). I denne masteroppgaven skal det blant annet analyseres for to nickede varianter, hCG β n47/48 hvor β -subenheten er kløyvd mellom aminosyre 47 og 48 og hCG β n44/45 hvor β -subenheten er kløyvd mellom aminosyre 44 og 45.

En stor del av hCG som gjenfinnes i urin hos gravide kvinner består av en isoform kalt hCG β -core fragment (hCG β cf). hCG β cf består av aminosyre 6-40 og 55-92 bundet sammen av 4 disulfidbindinger [7, 25]. Figur 4-4 gir en oversikt over 15 isoformer av hCG og hCGh som kan oppstå ved dissosiasjon og/eller degradering og som kan detekteres i urin og/eller serum i

forbindelse med normale og abnormale svangerskap, svangerskapsrelaterte sykdommer (GTD) og ikke-trofoblastrelaterte tumorer.



Figur 4-4: Struktur for 15 vanlige hCG-isoformer som fremkommer ved dissosiasjon og /eller degradering av hCG eller hCGh. Tallene viser til aminosyreenheter, mens N og O referer til N-bundet og O-bundet sukkermolekyler [24].

4.2.3 Biologisk forekomst og funksjon

hCG er et hormon med stor strukturdiversitet og mange ulike funksjoner i kroppen. hCG produseres naturlig i hypofysen, av trofoblastceller ved normale og abnormale svangerskap og i forbindelse med en rekke former for kreft [6, 7, 19].

hCG β og LH β deler omlag 80 % av samme aminosyresekvens. Dette resulterer i at hCG og LH virker på de samme LH/hCG-reseptorene i kroppen [9]. Kun intakt hCG og hCGh utøver hCG-spesifikk aktivitet, men nyere forskning viser at fritt hCG β fremmer vekst av tumorceller ved å hemme apoptose [6].

Pituitært hCG:

Hos både kvinner og menn skiller hypofysen daglig ut små mengder hCG [6]. Pituitært hCG følger samme sekresjonsmønster som LH, og på grunn av nevnte strukturellighet utøver LH og hCG samme effekt; hos kvinner stimuler pituitært hCG til eggløsning, mens hos menn stimuleres Leydig-cellene til testosteronproduksjon. Sekresjonen øker med alder, og hos kvinner i overgangsalderen kan konsentrasjonen bli så høy at graviditetstester kan gi positivt utslag [19].

Normale svangerskap:

hCG er best kjent som graviditetshormonet. Når et egg er blitt befruktet produseres hCG i cytotrofoblastceller, og starter mange prosesser i kvinnens kropp for å bære fram barnet. Den umiddelbare funksjonen til hCG er å opprettholde progesteronproduksjonen i corpus luteum slik at nye egg ikke modnes, samt at det befruktede egget fester seg til livmorveggen. hCG fremmer også vekst og differensiering av livmor, placenta og foster, samt differensiering og opprettholdelse av blodstrøm mellom mor og barn gjennom placenta og navlestreng. I tillegg bidrar hCG i en immundependende respons slik at fosteret ikke skal oppfattes som kroppsfræmmet og avstøtes [6]. hCGh er den vanligste isoformen i urin og serum inntil 3-4 uker etter befruktning. Senere i svangerskapet overtar vanlig hCG som hovedisoform i blod og hCG β cf utgjør største andelen av totalt hCG i urin. hCG-konsentrasjonen er høyest 7-10 uker ut i svangerskapet, for deretter å avta gradvis mot fødsel [24].

Abnormale svangerskap:

hCG produseres i større eller mindre grad ved abnormale svangerskap [24]. Ved spontanabort og ektopiske svangerskap sees reduserte nivåer av hCG, mens ved graviditeter hvor barnet har Downs Syndrom kan konsentrasjoner av hCG i serum være opp mot det dobbelte av hva tilfellet er ved normale svangerskap. Måling av serum-hCG sammen med tre andre biomarkører benyttes for å diagnostisere svangerskap med Downs syndrom [7].

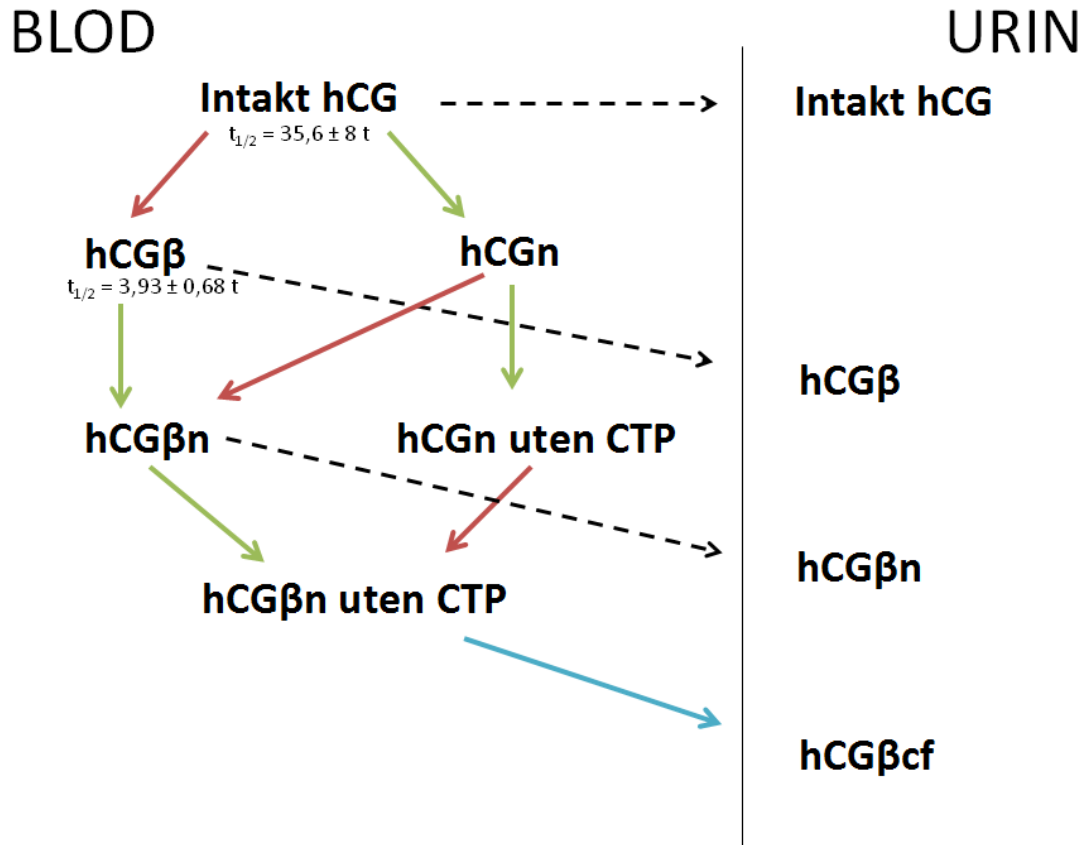
Svangerskapsrelaterte sykdommer, kreft og maligne tilstander:

Ulike hCG-isoformer er assosiert ved ulike former for kreft og maligne tilstander [6, 8, 24]. Svangerskapsrelaterte sykdommer (GTD) er en gruppe sykdommer med utspring fra cellevev i livmor og placenta. GTD kan deles inn i benigne og maligne tilstander. Et eksempel på benign sykdom er hydatiform mola, mens maligne tilstander omfatter choriocarcinoma, invasiv mola, epiteloid trofoblasttumor og PSTT (placental site trophoblastic tumor – tumor lokalisert til placenta). I disse sykdommene er det hyperglykosylerte varianter av hCG og hCG β som utøver aktivitet [6].

hCG, i form av fritt hCG β , er også observert i varierende grad hos pasienter med ikke-trofoblastrelateret tumorer. Studier har vist at hCG β hemmer apoptose og dermed fører til økt celle- og tumorvekst. Forskere mener dette skyldes stor grad av strukturlikhet mellom hCG β og tumor vekstfaktor β (TGF β), og at hCG β og TGF β har utspring fra samme evolusjonsopphav [6]. Eksempler på slike tumorer er testikkel og eggstokkkreft med opphav i kjønnscellene, men også ved kreft i blære, nyrer, prostata, lunge og bryst er hCG-isoformer påvist i varierende grad i blod, urin og/eller tumorvev [8]. Påvisning av hCG β i blod eller hCG β cf i urin er gode markører på aggressiv og langt fremskreden kreftsykdom [6].

4.2.4 Metabolisme

Dissosiasjon og degradering er trinn i nedbrytningsprosessen av hCG [24]. Sirkulerende intakt hCG har halveringstid på $35,6 \pm 8$ timer, mens hCG β elimineres mye raskere med halveringstid på $3,93 \pm 0,68$ timer. Nickede varianter med og uten C-terminalt peptid sirkulerer kun noen få minutter før de elimineres via nyrer eller lever [6]. hCG β cf er ikke påvist i blod. Det antas derfor at hCG β cf dannes i nyrene [7, 26]. Metabolisme av hCG foregår hovedsakelig i lever, mens 22 % skilles ut via nyrene. Figur 4-5 viser hvordan hCG dissosierer, degraderer og brytes ned i kroppen og hvilke isoformer som er tilgjengelig i henholdsvis blod og urin.



Figur 4-5: Dissosiasjon, degradering og utskillelse av intakt hCG samt halveringstider ($t_{1/2}$) [24]. Rød pil: Dissosiering av subenheter. Grønn pil: Nicking av β -kjede ved elastaser. Blå pil: Degradering ved exoproteinaser og glykosidaser i nyrene. Stiplet pil: Utskillelse til urin.

4.3 Doping

Ordet doping kommer fra det flamske ordet «dop» som betyr blanding [27]. Doping er ikke et nytt fenomen. Allerede på 1800-tallet er det beskrevet bruk av stoffer som stryknin, koffein, kokain og alkohol for å fremme prestasjon og utholdenhet i ulike idretter. Rundt 1930-tallet klarte forskere å isolere testosteron for første gang og etter hvert kom også syntetisk fremstilte testosteronanaloger på markedet. På 1960-tallet fikk bruken av anabole androgene steroider (AAS) sitt gjennombrudd i friidrett og styrkeøvelser. Amfetamin og andre stimulerende stoffer dominerte i utholdenhetsgrener. Senere har nye dopingformer som blod- og gendoping skapt utfordringer for dopingjegerne [27, 28].

Etter flere dødsfall rundt midten av 1900-tallet innen fotball- og sykkelporten som følge av doping med blant annet amfetamin, ble det større fokus på dopingkontroll av utøvere og systematisk antidopingarbeid. Den Internasjonale Olympiske Komite (IOC) utarbeidet i 1967

den første listen over forbudte stoffer og innførte dopingkontroller under de olympiske lekene det påfølgende året. Det skulle likevel gå nesten 30 år til før en uavhengig internasjonal antidopingorganisasjon ble grunnlagt. World Anti-Doping Agency (WADA) så dagens lys i 1999 og har siden den gang arbeidet med å sette internasjonale standarder for antidopingarbeid uavhengig av statlige interesser [27, 28].

4.3.1 Avgivelse og analyse av dopingprøver

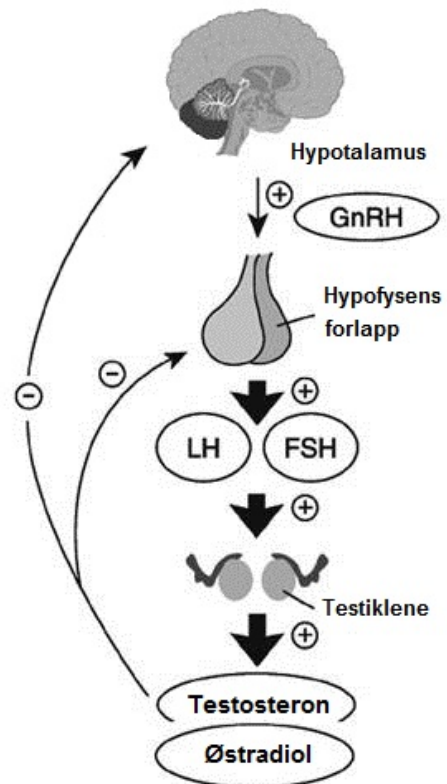
Alle idrettsutøvere som driver konkurranseidrett må til enhver tid regne med å bli dopingtestet. Utøvere kan bli innkalt til kontroll med eller uten forvarsel, og i eller utenfor konkurranse [29, 30]. Dopingprøven avgis under oppsyn av en dopingkontrollør. Utøveren har selv plikt til å kontrollere at alt utstyr som benyttes i forbindelse med dopingkontrollen er rent og forseglet. På den måten er utøveren sikret at ingen har tuklet med dopingprøven hans eller hennes. Dopingprøven fordeles av utøver selv i to flasker eller rør merket A og B og forsegles. Denne forseglingen brytes først ved analysestart på et WADA-akkreditert laboratorium [29, 30].

Når dopingprøven skal analyseres brytes forseglingen på A-prøven. Et gitt volum tas ut, og det utføres en screeninganalyse på alle forbudte stoffer. Ved positivt utslag på et eller flere stoffer under screeninganalysen, tas et nytt volum ut av A-prøven. Det utføres en bekreftelsesanalyse på de mistenkelige stoffene for å av- eller bekrefte funnene. Hvis både screeninganalysen og bekreftelsesanalysen gir positivt utslag for ett eller flere forbudte stoffer varsles utøveren og analyse av B-prøven gjennomføres [29]. Utøveren eller en representant for utøveren har rett til å være tilstede under analyse av B-prøven. Er B-prøven negativ henlegges saken. Er B-prøven positiv varsles nasjonale og internasjonale særforbund samt WADA, og utøveren må forvente seg sanksjoner som bøter og tidsbestemt utestengelse fra idretten [29, 30].

4.3.2 Regulering av endogen testosteronproduksjon

Testosteron er det mannlige kjønnshormonet. Noen av testosteronets effekter er utvikling av primær og sekundære kjønnskarakter (som kjønnsorganer, hårvekst og mørk stemme), maskulin atferd, libido og spermieproduksjon. I tillegg stimulerer også testosteron proteinsyntesen og dermed også oppbygging av skjelett og muskler. Dette kalles anabole effekter [31].

Figur 4-6 [32] viser hvordan endogen testosteronproduksjon reguleres. Testosteron produseres i Leydig-cellene i testiklene og produksjonen reguleres av hormonet LH som skilles ut av hypofysen. Reguleringen av testosteronproduksjonen styres av en såkalt negativ feedback-mekanisme [31]. Hypotalamus produserer gonadotropinfrigjørende hormon (Gn-RH) som virker på hypofysens forlapp slik at denne produserer glykoproteinhormonene LH og FSH. LH stimulerer Leydig-cellene i testiklene til å produsere testosteron. Når konsentrasjonen i plasma når et visst nivå, virker testosteron hemmende på reseptorer i hypotalamus og hypofysen. Dette resulterer i redusert frisetting av Gn-RH og LH, og dermed redusert testosteronproduksjon. Når plasmakonsentrasjonen kommer under et visst nivå opphører hemmingen og testosteronproduksjonen øker igjen [31].



Figur 4-6: Regulering av endogen testosteronproduksjon.

4.3.3 Anabole androgene steroider

Anabole androgene steroider (AAS) er en gruppe testosteronliknende steroider som har vært misbrukt av idrettsutøvere siden 1950-tallet [33]. AAS står oppført på WADAs liste over stoffer som er forbudt å bruke innen all idrett, både i og utenfor konkurranse [11]. Det finnes ingen eksakte tall på hvor omfattende misbruken av AAS er, men den antas å være utbredt i treningsstudiomiljøer og spesielt blant de som løfter vekter [33-35].

Anabol henspiller på skjelett- og muskeloppbyggende egenskaper, mens androgen refererer til effekten stoffene har til å fremme maskuline egenskaper. Bodybuildere og atleter ønsker å utnytte den anabole effekten for å øke muskelmassen [36]. Testosteron har forholdet 1:1 mellom anabole og androgene egenskaper. AAS er syntetiske derivater av testosteron som er laget for å øke den anabole:androgene ratioen. Høy ratio gir økt anabol effekt i forhold til androgene bivirkninger. Likevel har alle AAS en viss androgen effekt [37, 38].

Bivirkninger:

Bruk av AAS medfølger en rekke bivirkninger. Grad av bivirkninger avhenger av hvilke type(r) AAS inntatt, dose og lengden på misbruket [36-38].

Bivirkningene kan deles inn i fysiske og psykiske. Fysiske bivirkninger omfatter redusert endogen testosteronproduksjon som kan føre til redusert testikkelvolum, redusert spermieproduksjon, endret sexlyst og infertilitet. Andre fysiske bivirkninger som fremkommer ved langvarig misbruk er hårtap, akne, økt fare for kreft i prostata og lever, og negative endring i LDL/HDL- balansen som på sikt kan fører til hjerte-karsykdommer som høyt blodtrykk, infarkt og blodpropp. Økt plasmakonsentrasjon av androgene stoffer gir økt omdanning av androgener til østrogen som igjen fører til vekst av brystkjertelvev og såkalte «man-boobs». Karakterforandringer, humørsvingninger, aggressiv adferd, angst, depresjoner, psykoser og abstinensreaksjoner ved seponering er eksempler på psykiske bivirkninger som følge av AAS-misbruk.

4.3.4 hCG i doping

hCG er i følge punkt S2 på WADAs liste over forbudte stoffer, en substans som er forbudt hos menn både i og utenfor konkurranse [11]. Det er ikke vist at hCG virker prestasjonsfremmende i idrettssammenheng hos kvinner. I tillegg har kvinner naturlig høyt nivå av hCG i blod og urin i forbindelse med graviditet. hCG er derfor ikke forbudt hos kvinner [10, 11].

hCG stimulerer til økt testosteronproduksjon, og kan dermed alene brukes av atleter til å øke muskelkraften. hCG er i midlertidig dyrere og mindre effektivt enn testosteron og AAS. Misbrukerpotensialet ligger i kombinasjonsbruk med AAS [10].

Ved misbruk av AAS tilføres kroppen store mengder testosteronanaloger som hemmer utskillelsen av LH fra hypofysen. Dette resulterer i mindre sirkulerende LH som kan stimulerer Leydig-cellene i testiklene, og dermed reduseres endogen testosteronproduksjon. Ved injeksjon av hCG i løpet av en steroidsyklus normaliseres testosteronproduksjonen som undertrykkes ved misbruk av AAS. Injeksjon av hCG reduserer graden av bivirkninger forårsaket av AAS [10].

Deteksjon av hCG i forbindelse med doping:

Analysene skal utføres ved WADA-akkrediterte laboratorier. hCG påvises i urinprøver. WADA stiller to krav til deteksjon av hCG [10, 15]:

1. Det skal benyttes to ulike immunoassays for med sikkerhet å kunne påvise hCG. Begge assayene skal være validert og demonstrert for slik bruk. Det er anbefalt, men ikke pålagt, at assayet som skal benyttes til screeninganalysen bør være i stand til å detektere totalt innhold av hCG i urin, inkludert intakt hCG, hCG α , hCG β , nickede varianter og hCG β cf. Assayet som skal benyttes til bekreftelsesanalyse bør kun detektere intakt hCG spesifikt.
2. Nedre deteksjonsgrense skal for hver av assayen være minst 5 IE/L

4.3.5 hCG-preparater

Det finnes to preparater med hCG som virkestoff på det norske markedet, Pregnyl[®] og Ovitrelle[®]. Legemiddelfirmaet Organon har markedsført Pregnyl[®] i Norge siden 1967, mens Merck Serono fikk markedsføringstillatelse for Ovitrelle[®] i 2001 [39, 40]. Begge preparatene har indikasjon for å indusere ovulasjon ved assistert befruktning hos kvinner. Pregnyl[®] er i tillegg indusert hos menn ved kryptorkisme; en tilstand hvor testiklene ikke er lokalisert i pungen [41], ved sviktende gonadotropinutskillelse fra hypofysen og ved sterilitet [38-40].

Pregnyl[®]:

Pregnyl[®] produseres ved å ekstrahere hCG ut av urin fra gravide kvinner (uhCG). I tillegg til intakt hCG inneholder preparatet derfor også dissosierte former (hCG α og hCG β) og degraderingsprodukter (nickede varianter og hCG β cf). Én ampulle Pregnyl[®] inneholder 5000 IE frysetørret hCG. Tørrstoffet løses i 1 mL natriumklorid 9 mg/mL før injeksjon [39, 42].

Ovitrelle[®]:

Ovitrelle[®] er en ferdigfylt sprøyte som inneholder 250 μ g rekombinant hCG (rhCG). rhCG har samme aminosyresekvens som endogent hCG og fremstilles ved å dyrke kinesiske hamsterovarieceller som bærer genkodingen for humant hCG, etterfulgt av en komplisert opprensingsprosess [40, 43]. Ovitrelle[®] inneholder derfor kun intakt hCG og det er lite batch-til-batch variasjon og høy renhetsgrad sammenlignet med Pregnyl[®] [43].

Farmakokinetiske egenskaper:

Det er blitt vist ved flere anledninger at 250 µg rhCG har samme biologiske aktivitet som 5000 IE uhCG administrert subkutant eller intramuskulært [7, 40]. Distribusjonen følger en bi-eksponentiell modell, og halveringstiden er ca. 30 og 33 timer for henholdsvis Ovitrelle® og Pregnyl®. Maksimal plasmakonsentrasjon nås etter ca. 6 timer for menn og 20 timer for kvinner. Denne forskjellen skyldes at kvinner har større grad av subkutant adipose fettvev som fungerer som et depot for hCG [39, 43]. Absolutt biotilgjengelighet er målt til ca. 40 %.

4.4 Biologiske matriks

I dopingsammenheng benyttes flere ulike biologiske matrikser for å påvise bruk av ulovlige stoffer hos idrettsutøvere. I henhold til artikkel 6.2 i WADAs dopingkode kan urin, blod og andre matrikser inkludert DNA og genprofiler benyttes til å avsløre juks [29]. Hvilken matriks som er best egnet avhenger av hvilke analytter det skal screenes for og om det skal gjøres kvalitative eller kvantitative påvisninger. Skal det gjøres kvantitative påvisninger for å finne ut hvilken mengde utøveren har inntatt, er det ønskelig med en stabil matriks, og serum eller plasma er ofte førstevalget. Om det er det nok å påvise at stoffet har vært brukt, benyttes ofte urin som prøvematriks da det er enklere for både utøver og dopingkontrollører å avgi/samle inn en urinprøve.

4.4.1 Urin

Produksjon av urin er en av kroppens viktigste måter å kvitte seg med avfallsstoffer på. Urin er en klar, gulaktig væske som dannes i nyrene som et resultat av tre ulike prosesser; filtrasjon, reabsorpsjon og sekresjon [31]. I gjennomsnitt produserer en voksen person 1,2-1,5 liter urin i døgnet. Denne urinmengden tilsvarer omtrent 50 g tørrstoff; 30 g urea, 0,7 g urinsyre, 1,5 g kreatinin og 8 g natriumklorid [44].

Urinens sammensetning varierer gjennom dagen, mellom dager og fra person til person. Sammensetningen påvirkes blant annet av væske og matinntak; hva som blir spist og drukket, og ikke minst hvor mye, hyppighet av vannlatning og fysisk aktivitet [45]. Dette gjør at biomarkører og legemidler kan foreligge i svært ulike konsentrasjoner i urin.

4.4.2 Serum

Fullblod er en komplisert matriks. 41-46 % består av røde blodceller, hvite blodceller og blodplater, mens resterende andel består av vann, proteiner, lipider, glukose, urea og uorganiske ioner. pH i blod er 7,4 [31, 46, 47]. Ved henstand vil cellene sedimentere og fibrinogen forårsake koagulering. Det gjør videre analyser vanskelig [47]. Det er derfor vanlig å benytte plasma eller serum for analyse av stoffer i blod.

Plasma defineres som ekstracellulærvæsken i blod [31]. Plasma oppnås ved å tilsette en antikoagulant, for eksempel heparin eller EDTA, til blodprøven [46]. En antikoagulant hindrer blodet i å koagulere, og kun blodceller sedimenterer i bunnen av prøvetakningsglasset.

I denne oppgaven skal serum benyttes. Serum dannes ved å la blodprøven stå på benk. Plasmaproteinet fibrinogen vil omdannes til et stort nettverk av uløselige trådaktige molekyler, fibrin, som fanger blodcellene til en geleaktig masse [31]. Blodet har koagulert. Etter henstand og sentrifugering ligger blodkoagelen i bunnen av prøvetakningsrøret og serum kan allikvoters over i et nytt rør. Serum har færre blodkomponenter enn plasma som kan interferer med videre prøveopparbeidelse og analyse.

4.5 Deteksjon av hCG i dag

Den første metoden for å påvise hCG ble utviklet i 1927 [23] og var en biologisk metode hvor urin fra gravide kvinner ble sprøytet inn i kaniner for å påvise graviditet. Biologiske tester var eneste mulige deteksjonsmetode for hCG inntil radioimmunoassays (RIA) ble utviklet på slutten av 60-tallet. I begynnelsen ble polyklonale antistoffer benyttet, men på grunn av lav spesifisitet (binding av både hCG og LH) og ny kunnskap, ble monoklonale antistoffer tatt i bruk på midten av 70-tallet. I dag benyttes monoklonale antistoffer via immunometriske metoder som enzymlinket-immunosorbent assays (ELISA) og RIA.

Testene kan også klassifiseres i to hovedgrupper etter hva slags hCG-isoformer de kan detektere [12]; tester for deteksjon av intakt hCG og tester for deteksjon av total hCG. Tester for deteksjon av intakt hCG består av antistoffer som kun detekterer hCG α - β -heterodimeren, mens total-hCG-tester binder både heterodimerer, fri β -subenhet og i noe grad degraderingsproduktene (nickede varianter og hCG β cf).

4.5.1 Prinsippet

Den vanligste metoden for deteksjon av hCG i dag baserer seg på «sandwich-prinsippet» hvor to antistoffer, ett «capture»-antistoff og et «tracer»-antistoff, bindes til ulike steder, epitoper, på intakt hCG og/eller isoformene [12]. «Capture»-antistoffet er som regel immobilisert på veggene og bunnen av 96-brønnsplater. «Tracer»-antistoffet er enzym-merket, og etter dannelsen av antistoff-substrat-antistoff-kompleks, tilsettes et enzymsubstrat og en fargereaksjon utløses. Grad av farge detekteres ved UV eller fluorescens, og er proporsjonal med mengde hCG.

RIA baserer seg på at en begrenset konsentrasjon antistoffer plasseres i et rør [12]. Deretter tilsettes den biologiske prøven og en bestemt mengde radioaktivt-jod-merket hCG. hCG fra prøven og radioaktivt-jod-merket hCG konkurrerer om binding til den begrensede mengden antistoffer. Etter en viss inkubasjonstid felles antistoffene ut, og radioaktiviteten måles. Dess høyere andel hCG i prøven dess lavere radioaktivt signal.

4.5.2 Utfordringer

Selv om immunometriske metoder er vist seg godt egnet til analyse av hCG, er det flere utfordringer knyttet til bruken [14]. Først og fremst viser tester fra ulike produsenter som er deklart for samme bruk, dårlig samsvar i resultater. Dette skyldes bruk av ulike antistoffer i de ulike assayene.

Utfordring nummer to er faren for falske positive resultater. Falske positive resultater oppstår når humane heterofile antistoffer binder opp «capture»- og «target»-antistoffet i en hCG-test og gir positivt utslag på testen til tross for at det ikke er hCG til stede i prøven [14, 23, 48, 49]. Antistoffene som er grunnlaget for sandwich-prinsippet i immunometriske metoder er av animalsk opphav. Ved stor grad av omgang med dyr eller gjennom animalske biprodukter ved for eksempel vaksinerings, kan det dannes humane antistoffer mot de ukjente animalske antistoffene [23]. Disse humane antistoffene kan bindes til antistoffene i hCG-assayet og gi falskt positivt resultat. Det har vært rapportert om flere tilfeller av feildiagnostisering av friske pasienter på grunnlag av falsk positive resultater som har skyldtes disse heterofile antistoffene. Dette har igjen resultert i unødvendig medisinsk behandling og/eller kirurgiske inngrep som har hatt fatale konsekvenser for den enkelte pasient [23, 48-50].

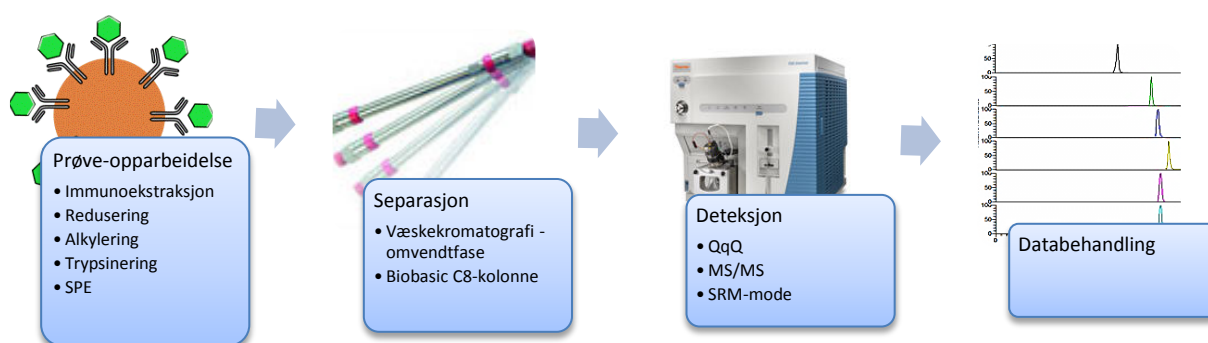
Immunometriske metoder kan også gi falsk negativt prøvesvar [14]. Ved høy hCG-konsentrasjon (>500.000 IE/L) i prøveløsningen kan både «capture»- og «tracer»-antistoffet

mettes med hver sine hCG-molekyler slik at få eller ingen «capture-hCG-tracer»-sandwichkomplekser dannes [23, 51]. Dette kalles Hook effekt. Ved mistanke om Hook-effekt skal prøven fortynnes før analyse med immunobaserte tester.

4.6 Immunoaffinitets-MS

Selv om immunoassays dominerer analyse av hCG per i dag, er andre metoder forsøkt utviklet. På begynnelsen av 2000-tallet ble en immunoaffinitets-MS-metode utviklet av en forskningsgruppe i Malaysia [16]. Metoden er todelt slik at prøveopparbeidelse og analyse utføres hver for seg. Prøveopparbeidelsen baserer seg på immunoaffinitetsekstraksjon hvor hCG-spesifikke antistoffer er pakket i en kolonne. Etter ekstraksjonen utføres tryptisk klipp, før signaturpeptider separeres og detekteres på LC-MS/MS. Metoden er utviklet for å detektere total hCG i forbindelse med doping, men er foreløpig ikke validert. Metoden er dermed heller ikke implementert i WADAs antidopingarbeid.

I de senere årene er en ny immunoaffinitets-MS-metode blitt utviklet og validert av Hanne Lund *et al.* [1-5]. Prøveopparbeidelsen baserer seg på selektive antistoffer rettet mot hCG og et utvalg hCG-isoformer, immobilisert på magnetiske kuler. Analysen utføres ved LC-MS/MS i SRM-mode. Selektiviteten i prøveopparbeidelsen samt selektiviteten og sensitiviteten i massespektrometeret gjør at hCG og hCG-isoformer kan detekteres svært nøyaktig og ned i meget lave konsentrasjonsområder. Figur 4-7 gir en skjematisk oversikt over trinnene i den nye immunoaffinitets-MS-metoden for deteksjon av hCG.



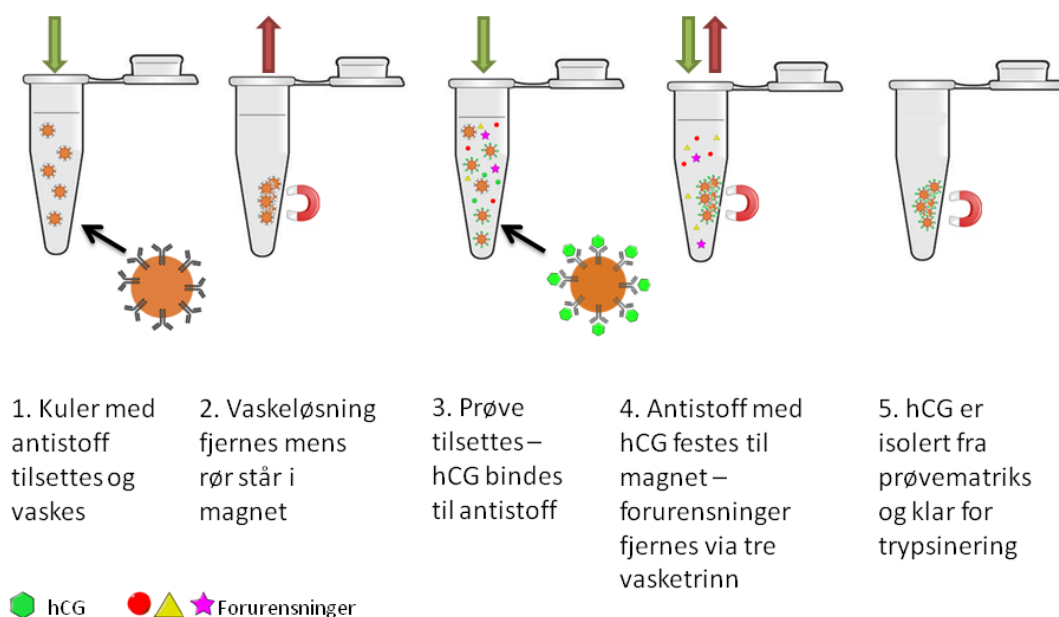
Figur 4-7: Oversikt over prinsippene som benyttes i immunoaffinitets-MS-metoden utviklet av Hanne Lund *et al.* [1-5] for deteksjon av hCG.

4.6.1 Prøveopparbeidelse

Biologiske prøver er komplekse blandinger bestående av mange forskjellige organiske og uorganiske komponenter, i tillegg til analytten som skal detekteres. For å hindre at matrikskomponentene hemmer analyttresponsen eller ødelegger analysesystemet er det viktig å ha en god prøveopparbeidelse som gir tilstrekkelig opprensning [52]. Analytter i biologiske matriks forekommer ofte i lave konsentrasjoner og oppkonsentrering som et ledd i prøveopparbeidelsen vil senke deteksjonsgrensen og dermed øke sensitiviteten i metoden [53].

Immunoaffinitetsekstraksjon:

Immunoaffinitetsekstraksjon er en svært selektiv prøveopparbeidelsesmetode hvor monoklonale antistoffer immobilisert på magnetiske kuler eller brønner benyttes. Antistoffene er spesifikke ovenfor det eller de molekylene som ønskes isolert. I denne oppgaven benyttes det hCG-spesifikke antistoffet E27, som selektivt bindes til en bestemt epitop på hCG β og isolerer intakt hCG, intakt nicked hCG, hCG β , nickede varianter av hCG β og hCG β cf [13]. Antistoffet er immobilisert på magnetiske kuler. Etter tilsetning av prøveløsning og dannelse av antistoff-hCG-komplekser, settes prøvene i en magnet. De magnetiske kulene med antistoff-hCG-komplekset bundet til overflatens festes til magneten, og prøveløsningen kan fjernes (figur 4-8). For å bedre opprensningen, gjennomføres tre vasketrinn slik at forurensninger i størst mulig grad fjernes.

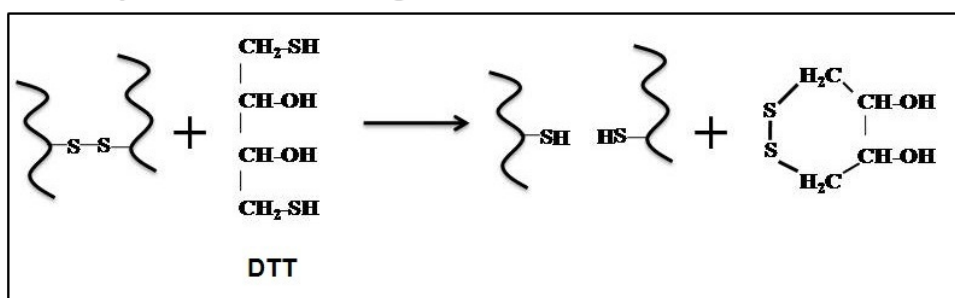
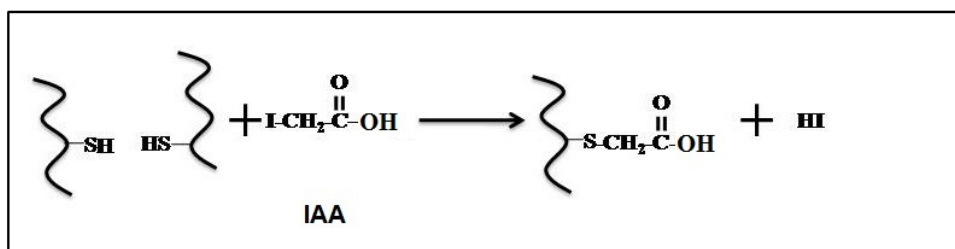


Figur 4-8: Prinsip for immunoaffinitetsekstraksjon av hCG.

Trypsinering:

Deteksjon av intakte proteiner ved bruk av massespektrometri er komplisert, og gir som regel svært dårlig følsomhet. Dette kan omgås ved å klippe opp proteiner til mindre peptidkjeder, gjerne i størrelsesorden 6-20 aminosyrer, før MS-deteksjon. Dette vil øke sensitiviteten og massenøyaktigheten i analysen [52]. Trypsin er et mye brukt, stabilt og godt karakterisert proteolytisk enzym, som er lett tilgjengelig i høy renhetsgrad. Trypsin utvinnes hovedsakelig fra bukspyttkjertel hos svin eller storfe. Trypsin klipper aminosyrekjeden etter alle lysin- og arginin-enheter i c-terminal-retning, med mindre lysin og arginin etterfølges av aminosyren prolin.

For at trypsin skal kunne klippe opp proteinet er det avgjørende at enzymet får tilgang til aminosyrekjeden. Intakt protein må ofte denatureres og eventuelle disulfidbindinger brytes før trypsin kan tilsettes. Dette gjøres ved å tilføre varme samt tilsette et reduserings- og et alkyleringsreagens. Varmen fører til at proteinet mister sin karakteristiske konformasjon og foldes ut, mens reduseringsreagenset, ofte ditiotretiol (DTT), bryter disulfidbindingene. For å unngå at disulfidbindingene gjendannes, tilsettes et alkyleringsreagens umiddelbart. Ofte benyttes jodeddiksyre (IAA) til å deaktivere de frie SH-gruppene. Proteinets har nå mistet sin tredimensjonale konformasjon og er klar for tryptisk klipp. Figur 4-9 viser prinsippet for reduksjon og alkylering av disulfidbindinger.

Reduksjon av disulfidbindinger med DTT**Alkylering av frie SH-grupper med IAA**

Figur 4-9: Reduksjon av disulfidbindinger med ditiotretiol (DTT) til frie SH-grupper. I neste trinn alkyleres de frie SH-gruppene med jodeddiksyre (IAA) slik at disulfidbindingene ikke kan gjendannes.

Signaturpeptid:

Trypsin benyttes til å klippe opp proteiner til mindre peptider som egner seg for LC-MS-analyse. Noen tryptiske peptider er spesifikke for forelderprotein. Disse kalles signaturpeptider. Deteksjon av signaturpeptid indikerer deteksjon av forelderprotein. Utvelgelsen av et signaturpeptid gjøres ved hjelp av algoritmer og databaser [54]. I denne oppgaven benyttes fem signaturpeptider for å detektere intakt hCG, dissosiasjons- og degraderingsprodukter. Tabell 4.1 viser signaturpeptidene til de ulike hCG-isoformene samt aminosyresekvens og aminosyreposisjon [2, 4].

Tabell 4.1: Nomenklatur, aminosyreposisjon og aminosyresekvens for signaturpeptidene som er inkludert i immunoaffinitets-MS-metoden [2, 4].

Subenhet	Isoform	Signaturpeptid	AA ¹ -posisjon	AA ¹ -sekvens
α	hCGα	α T2	35-42	AYPTPLR
β	hCGβ	β T5	44-60	VLQGVLPALPQVVCNYR
	hCGβn47/48	β nT5-47/48	48-60	VLPALPQVVCNYR
	hCGβn44/45	β nT5-44/45	45-60	LQGVLPALPQVVCNYR
	hCGβcf	β cfT9	75-92	GVNPVVSYAVALSCQCAL

¹AA = Aminosyre

Fast-Fase-Ekstraksjon (SPE):

Fast-fase-ekstraksjon (SPE) er en form for prøveopparbeidelse som isolerer ønsket analytt, gir god opprensing og mulighet for stor grad av oppkonsentrering [47]. SPE baserer seg på stoffers evne til å fordele seg mellom overflaten på fast stoff, sorbent, og en løsning. Fordelingen avhenger av interaksjoner mellom analyttens, sorbentens og væskens funksjonelle grupper. For å optimalisere SPE-prosedyren kan sorbentmaterialet og sammensetning av væskeløsning og elueringsløsning varieres. Væsken suges eller presses gjennom sorbenten ved hjelp av for eksempel vakuum eller sentrifugalkraften.

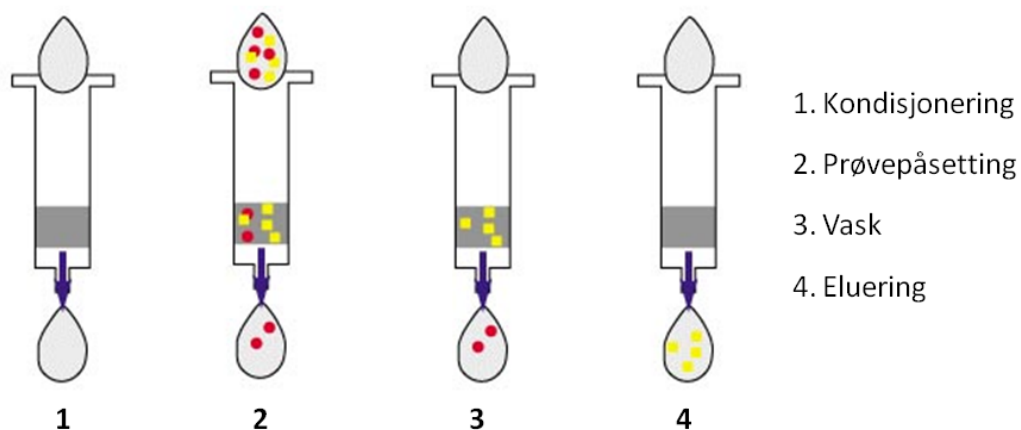
SPE består generelt av fire trinn (figur 4-10):

1. Kondisjonering – Aktivisering av sorbentmateriale. Løsemiddel med høy løsemiddelstyrke presses gjennom kolonnen etterfulgt av løsemiddel med lav løsemiddelstyrke.

2. Prøvepåsetting – Ønsket prøvolum settes på kolonnen. Prøveløsningen har svak løsemiddelstyrke slik at analytten søker interaksjon og adsorpsjon til sorbent istedenfor løsning.

3. Vask – For å fjerne forurensninger av mer polar karakter enn analytten selv, vaskes sorbenten med en løsning med høyere løsemiddelstyrke enn prøveløsningen, men litt lavere styrke enn elueringsløsningen.

4. Eluering – Analytten elueres ut med en løsning med tilstrekkelig løsemiddelstyrke. Er løsemiddelstyrken for lav vil ikke analytten elueres tilstrekkelig. Er løsemiddelstyrken for høy vil upolare forurensninger koeluere med analytten.



Figur 4-10: Generell prosedyre for fast-fase-ekstraksjon [55].

Etter eluering dampes eluatet inn og analytten reløses i et mindre volum som gir ønsket grad av oppkonsentrering. Dette kan være nødvendig i dopinganalyser da analytten ofte foreligger i svært lave konsentrasjoner.

Intern Standard:

Intern standard benyttes generelt for å korrigere for tilfeldige endringer under prøveopparbeidelse eller kompensere for variasjoner i analyseinstrumentet [47, 54]. Intern standarden bør ha fysikalsk-kjemiske egenskapet mest mulig lik analyttens, men må likevel kunne detekteres hver for seg.

Når MS benyttes som detektor, benyttes vanligvis isotopmerkede utgaver av analytten som intern standard. I peptidanalyse byttes en aminosyre på signaturpeptidet ut med en tilsvarende isotopmerket aminosyre 6-10 Da tyngre [54]. Signaturpeptid og isotopmerket intern standard vil ha identiske kromatografiske-, ioniserings- og fragmenteringsegenskaper, men på grunn av ulik masse vil det genereres spesifikke MS-spekter for de respektive.

4.6.2 LC-MS

LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) er en mye anvendt analyseteknikk hvor kromatografisk separasjon og massespektrometrisk deteksjon kombineres til svært spesifikke og sensitive metoder [56]. LC-MS har blitt en av de viktigste metodene for å oppnå raske, robuste, sensitive og spesifikke analyser i arbeidet mot doping [57]. Utviklingen av stadig nye LC-MS-metoder har gjort det mulig å påvise svært lave konsentrasjoner av både lav og høymolekylære ulovlig inntatte forbindelser i biologiske prøver.

Separasjon: Væskekromatografi (HPLC)

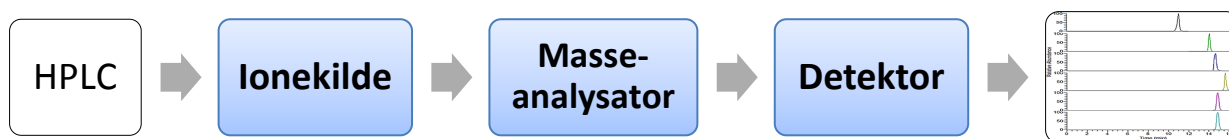
Kromatografi er en fellesbetegnelse på et separasjonsprinsipp som baserer seg på fordeling av analytter mellom en mobilfase og en stasjonærfase [47]. Stasjonærfasen kan være en væske eller et fast stoff, mens mobilfasen kan være væske eller gass. I væskekromatografi består stasjonærfasen av porøse partikler med stor overflate, coatet med funksjonelle grupper tettepakket i en kolonne. Mobilfasen er en væske bestående av vann og/eller organisk løsningsmidler, som pumpes gjennom kolonnen. Kjemiske egenskaper hos analyttene, funksjonelle grupper i stasjonærfasen og mobilfasesammensetningen avgjør hvilke rekkefølge analyttene separeres etter. Sterke interaksjoner mellom analytt og stasjonærfase gir lang retensjonstid og dermed lang analysetid. For å redusere analysetiden kan en mobilfasegradient benyttes. Ved å endre sammensetningen av mobilfasen i løpet av analysetiden, vil stoffer med svært ulike kjemiske egenskaper separeres på kortere tid.

I denne oppgaven ble omvendtfasekromatografi benyttet som separasjonsprinsipp. Det er det mest anvendte separasjonsprinsippet i væskekromatografi. I omvendtfasekromatografi består stasjonærfasen av porøse partikler coatet med hydrofobe sidekjeder, mens mobilfasen er en vandig løsning tilsatt organisk modifikator. Hydrofobe analytter retarderes sterkest på kolonnen og vil få lengere retensjonstid enn hydrofile analytter som har svak interaksjon med stasjonærfasen. Analytter i biologiske prøver analyseres som regel ved omvendtfasekromatografi da biologiske matrikser er av vandig karakter og dermed forlikelig med vandig mobilfase [47].

Deteksjon: Massespektrometri (MS)

For å påvise stoffene som er blitt separert ved HPLC, ble det i denne oppgaven benyttet et massespektrometer (MS). Som figur 4-11 viser, består en MS av tre hoveddeler; ionekilde hvor analytten blir ionisert og overført til gassform, masseanalysator hvor stoffene skilles

etter masse-ladnings-forhold (m/z -verdier) og en detektor som registrerer signalet fra de ulike ionene [52, 58].

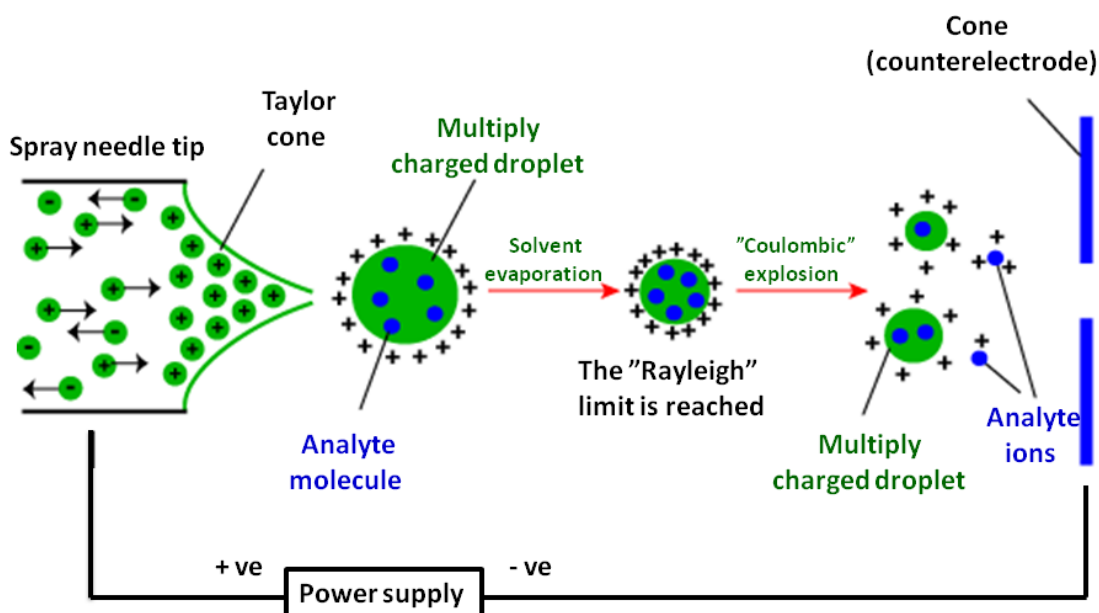


Figur 4-11: Et massespektrometer består av tre hoveddeler; ionekilde, masseanalysator og detektor.

Ionekilde – Elektrosprayionisering (ESI):

Deteksjonsprinsippet i massespektrometri baserer seg på påvisning av ioner med ulike m/z -verdier. Det er derfor avgjørende at analytten er ladd og i gassfase før den føres inn i massespektrometeret [59]. Elektrosprayionisering er en myk ioniseringsteknikk som foregår ved atmosfæretrykk, og er en av de mest brukte ioniseringsteknikkene i forbindelse med LC-MS. ESI kan utføres i positiv eller negativ mode avhengig av om analytten er henholdsvis en base eller syre. Peptider er bygget opp av aminosyrer med både sure og basiske egenskaper. Ved lav pH protoneres de basiske aminene, og peptidene vil få en netto positiv ladning [52].

Prinsippet bak ESI [52, 58, 59] er at væskestrømmen fra HPLC presses gjennom en nål eller et kapillær med høy spenning (2-5 kV). Ved utgangen av kapillæret og i nærvær av et elektrisk felt, blir væskestrømmen sprayet ut som en aerosol av små ladde dråper. Varm tørkegass (ofte nitrogen) møter dråpene, og bidrar til at væsken fordamper. Denne fordampingen gjør dråpene stadig mindre og overflatespenningen øker. Når overflatespenningen blir tilstrekkelig stor, eksploderer dråpene til enda mindre dråper; dette kalles «Couloumb explosion». Denne prosessen gjentas inntil analytten foreligger som ioner i gassfase. Positiv eller negativ spenningsforskjell mellom utgangen av kapillæret og inngangen til MS fører til at ladde analyttmolekyler trekkes mot og inn i massespektrometeret. Figur 4-12 viser skjematisk hva som skjer ved elektrosprayionisering.

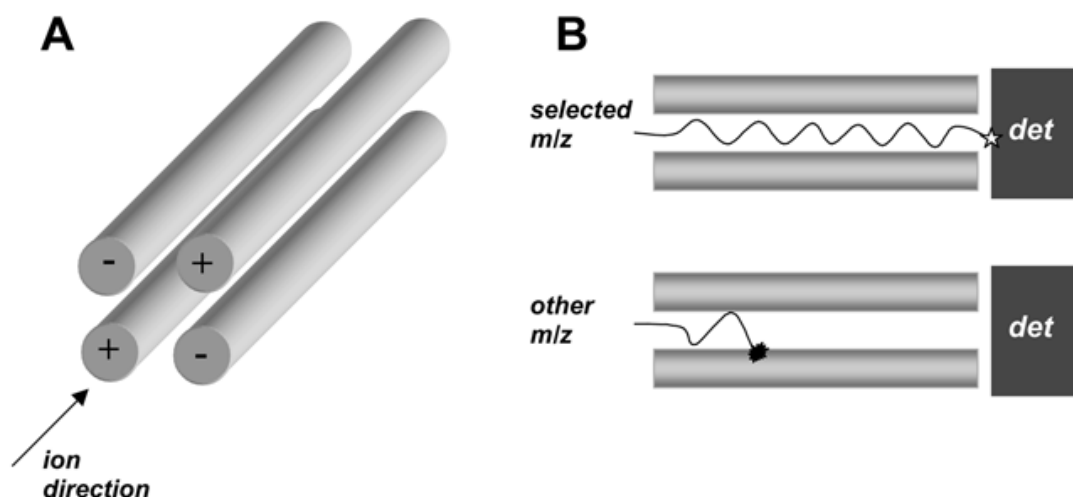


Figur 4-12: Elektrosprayionisering – prosessen hvor separerte analytter i væskestrøm fra HPLC blir omdannet til ladde analytter i gassform og ført inn i MS [60].

Masseanalysator – Trippelkvadrupol (QqQ):

En masseanalysator separerer og detekterer ioner med hensyn på masse-ladnings-forhold, m/z -verdier. Trippelkvadrupol (QqQ) er sammen med time-of-flight og ionefelle de mest brukte masseanalysatorene [59].

En kvadrupol består av fire metallstaver, en i hvert hjørne av en imaginær firkant (figur 4-13A) [52]. Stavene har vekselvis positiv og negativ ladning, men diagonalt motstående staver har alltid lik ladning. Likestrøm og høyfrekvent spenning (radiofrequency voltage) på metallstavene danner et elektrisk felt hvor ioner med bestemte m/z -verdier oscillerer mellom stavene mot detektor [52, 58]. Ioner med ikke-ønskede m/z -verdier blir ikke stabilisert i kvadrupolen, men kolliderer med metallstavene og nøytraliseres (figur 4-13B). Ved å variere spenningen på metallstavene detekteres ioner med ulike m/z -verdier. Når ionene treffer detektor genereres en liten mengde strøm, total ion count (TIC).

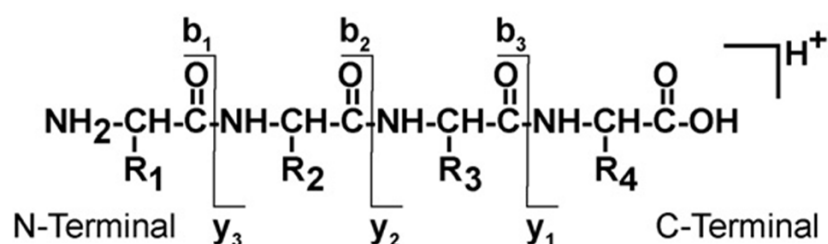


Figur 4-13: Kvadrupolmasseanalysator-prinsippet [52]. **A:** Fire metallstaver er plassert parallelt hvor diagonalt motstående staver alltid har samme ladning. **B:** Stabilisering av på forhånd utvalgte m/z -verdier.

En trippelkvadrupol består av tre etterfølgende kvadrupoler [52]. I første kvadrupol (Q1) stabiliseres alle eller noen utvalgte ioner. De stabiliserte ionene føres inn i neste kvadrupol (q2) som er en kollisjonscelle hvor inert gass, ofte Argon (Ar), tilføres og kolliderer med ionene slik at disse fragmenteres. I den siste kvadrupolen (Q3) stabiliseres noen av eller alle fragmentene som ble dannet i q2, og føres inn i detektor.

Fragmentering av peptider i MS/MS:

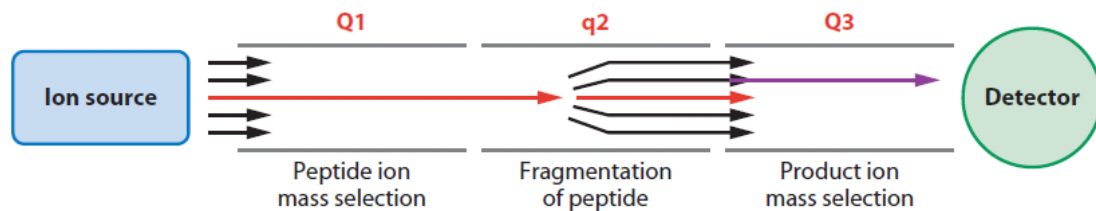
Når peptidioner kolliderer med argon-gass i q2 spaltes peptidkjeden på ulike steder [52]. Den vanligste spaltingen skjer mellom karbonylgruppen og nitrogenet i amidbindingen, og det dannes såkalte y- og b-ioner. y-ion er peptidfragmentene fra c-terminal ende, mens b-ion er peptidfragmentet regnet fra n-terminal ende på forelderpeptidet (figur 4-14). Noen fragmentioner dannes hyppigere enn andre. Økende grad av fragmentering oppnås ved å øke energien på kollisjonsgassen i q2.



Figur 4-14: Nomenklatur for fragmentering av peptidioner [58].

Selected Reaction Monitoring (SRM):

QqQ-instrumenter gir en unik mulighet til å utføre svært selektive og sensitive analyser, såkalt selected reaction monitoring (SRM) [52, 61]. I SRM-analyser stabiliseres utvalgte m/z -verdier i Q1. Ionene med de bestemte m/z -verdien føres inn i q2 hvor inert argongass bombarderer molekylionene og fragmenter dannes. I Q3 stabiliseres og detekteres utvalgte fragmentioner (figur 4-15). Monitoreringen av et molekylion og etterfølgende fragmentation kalles en overgang. Analyse i SRM-mode fører til lavere deteksjonsgrensen og økt sensitivitet i forhold til tradisjonelle full scan-innstillinger hvor alle masser detekteres. For å lage SRM-metoder velges fragmentioner i Q3 som gir høyest og mest stabil signalintensitet slik at metoden får høy reproduserbarhet.



Figur 4-15: Selected Reaction Monitoring (SRM). Ett eller flere peptidioner velges ut i Q1 og fragmenteres av kollisjonsgass i q2. I Q3 monitoreres ett eller flere fragmentioner av moderionet [61].

5. Materialer

5.1 Kjemikalier, proteiner og utstyr

Tabell 5.1-5.7 gir en oversikt over kjemikalier, proteiner og utstyr som ble benyttet i arbeidet med denne oppgaven.

Tabell 5.1: Kjemikalier.

Kjemikalie	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril, CH_3CN	LC-MS-kvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Ammoniumbikarbonat, NH_4HCO_3	$\geq 99,5 \%$	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Dinatriumfosfatdihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,5 \%$	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
DTT (1,4-ditiotretiol), $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	$\geq 99,0 \%$	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
IAA (Jodeddiksyre), $\text{C}_2\text{H}_3\text{IO}_3$	$\sim 99,0 \%$	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenfosfat, KH_2PO_4	Analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid, KCl	$> 99,5 \%$	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Maursyre, HCOOH	$\sim 98 \%$, MS-kvalitet	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Metanol, CH_3OH	$\geq 99,9 \%$ LC-MS-kvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Natriumklorid, NaCl	$\geq 99,5 \%$	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Saltsyre, HCl	37 %, analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland

Kjemikalie	Kvalitet	Leverandør
TFA (Trifluoreddiksyre), C ₂ HF ₃ O ₂	≥ 98 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Tris, NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	> 99 %	Fluka BioChemika, Sveits
Tween 20	-	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA

Tabell 5.2: Proteiner og peptider.

Protein	Kvalitet	Leverandør
Intern standard, isβT5, «VLQGVLPALPQV- VCNY[RC13N15]»	> 95 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Ovitrelle [®] , 250 µg hCG/0,5 mL	Legemiddel, injeksjonsvæske, oppløsning i ferdigfylt sprøyte	Serono Europe Ltd., London, Storbritannia
Pregnyl [®] , 5000 IE hCG/ampulle	Legemiddel, pulver til injeksjonsvæske	N. V. Organon, Oss, Nederland
Trypsin fra bovin pankreas	96,1 %	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA

Tabell 5.3: Utstyr i forbindelse med prøvetaking under studien.

Utstyr	Modell	Produsent
Vakuumsprøyte til serumanalyser	BD Vacutainer SST™ II Plus Advance 7/5 mL	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Glassrør til oppbevaring av serumprøver i fryser	5 mL, 75×12 mm	Sarstedt, Tyskland
Hvite korker til glassrør	Push cap, neutral	Sarstedt, Tyskland
Sentrifugerør	50 mL med skrukork, sterile	VWR, USA
Flaske, vid hals, med skruelukk til urinprøver	LDPE, naturfarget, 250 mL	VWR, USA

Tabell 5.4: Utstyr til immunoekstraksjon.

Utstyr	Modell	Leverandør
Antistoffer	E27	Radiumhospitalet Oslo Universitetssykehus, Norge
Magnetiske kuler	Dynabeads kuler [®] M-280, tosylaktivert	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Magnetstativ	DynaMag [™] -2	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Prøveblander	HulaMixer [™]	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabell 5.5: Utstyr til LC-MS/MS.

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler/-injektor	WPS-3000TRS	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
Detektor	TSQ Quantum Access	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Programvare	Chromeleon v. 6.80 SR6	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
	Xcalibur v. 2.0.7 SP1	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Pumpe	LPG-3400M	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
Separasjonskolonne	Biobasic C8 Dimensjon: 50×1 mm, Partikkelstørrelse: 5 µm	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

Tabell 5.6: Øvrig utstyr; forbruksmateriell.

Utstyr	Modell	Produsent
Empore C8	Empore Extraction Disks C8 47 mm	Phenomenex International, Torrance, CA, USA
Eppendorfrør	2,0 mL	Sigma-Aldrich inc., St. Louis, MO, USA
Eppendorfrør, LoBind (for proteiner)	1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland

Utstyr	Modell	Produsent
Glasspasteurpipetter	150 mm, 230 mm	VWR international, Leuven, Belgia
Hvite korker til vialer	-	Holger Teknologi AS, Oslo, Norge
Inserts	31 x 6 mm, 0,1 mL	VWR international, Leuven, Belgia
Pipettespisser	Finntip® Biohit®	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA Biohit Oyj, Helsinki, Finland
Sentrifugerør	15 mL med skrukork, sterile	VWR international, Leuven, Belgia
Vialer	32 x 11,6 mm	Matriks AS, Oslo, Norge

Tabell 5.7: Øvrig utstyr; ikke forbruksmateriell.

Utstyr	Modell	Produsent
Automatpipetter	Finnpipette® Biohit®	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA Biohit Oyj, Helsinki, Finland
Inndampningsenhet (med mulighet for varme og nitrogen)	Techne, Dri-Block® DB-3D	Fischer Scientific, Oslo, Norge
pH-meter	827 pH lab	Methron ion analysis, Sveits
Sentrifuge	Centrifuge 5804 Hettich Universal 32R	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland Hettich Zentrifugen, Tyskland
Liten sentrifuge	Galaxy mini	VWR international, Leuven, Belgia
Thermomixer	Comfort eppendorf 1,5 mL	Fischer Scientific, Oslo, Norge
Ultralydbad	Ultrasonic Cleaner	VWR international, Leuven, Belgia

Utstyr	Modell	Produsent
Vannrenseanlegg	Milli-Q [®] Intergral 3	Millipore A/S, Norge
Vekt	XS 205 dualrange	Mettler-Toledo, Oslo, Norge
Vortex-mikser	IKA [®] MS3 digital	IKA Works inc., Wilmington, NC, USA

5.2 Tillaging av løsninger

hCG-stamløsning og arbeidsløsning:

1 ampulle Pregnyl[®] (5000 IE hCG) løses i 1 mL ionebyttet vann og overføres til LoBind eppendorfrør. Arbeidsløsning lages ved å fortynne stamløsningen til 500.000 IE/L med ionebyttet vann. Arbeidsløsningen fryses ned i passende volumer.

Løsninger til standardkurve og QC-prøver:

Konsentrasjon standardkurve: 10, 50, 100, 500 og 750 IE/L.

Konsentrasjon QC-prøver: 100 IE/L

Det lages én standardkurve for hver analyseserie på LC-MS og tilstrekkelig mange QC-prøver slik at én QC-prøve analyseres for hver tiende dopingprøve. Arbeidsløsningen (500.000 IE/L) brukes som utgangspunkt til spiking av standard- og QC-prøver. Prøvene lages i samme matriks som prøvene som skal opparbeides den aktuelle dagen.

Ammoniumbikarbonat-buffer (ABC-buffer):

50 mM ABC-buffer: 40 mg ABC-tørrstoff veies inn og løses i 10 mL ionebyttet vann.

200 mM ABC-buffer: 158 mg ABC-tørrstoff veies inn og løses i 10 mL ionebyttet vann.

Løsningen skal være dagfersk.

5.2.1 Løsninger til immunoekstraksjon

10*PBS-buffer (100 mL):

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 240 mg KH_2PO_4 veies ut og løses i en 100 mL målekolbe med ionebyttet vann. Løsningen har god holdbarhet på grunn av høy saltkonsentrasjon. Løsningen må oppbevares i romtemperatur på grunn av fare for utkrystallisering hvis oppbevaring kjølig.

1*PBS-buffer (10 mL):

1 mL 10*PBS tilsettes 9 mL ionebyttet vann. Løsningen skal være dagfersk.

1*PBS-buffer med 0,05 % Tween 20 (100 mL):

10 mL 10*PBS tilsettes 90 mL ionebyttet vann i en 100 mL målekolbe. Deretter tilsettes 50 μL Tween 20 og løsningen blandes. Løsningen er holdbar i inntil 3 måneder ved oppbevaring i kjøleskap.

10 mM Tris-HCl (500 mL):

609 mg tris løses i litt mindre enn 500 mL ionebyttet vann. pH justeres til 7,4 ved å tilsette dråpevis en løsning av konsentrert saltsyre og ionebyttet vann i forhold 1:3 under omrøring. pH måles med pH-meter. Deretter tilsettes ionebyttet vann til 500 mL i en målekolbe. Løsningen er holdbar i inntil 3 måneder ved oppbevaring i kjøleskap.

5.2.2 Løsninger til trypsinering

Reduseringsreagens:

100 mM DTT: 7,7 mg DTT veies inn og løses i 500 μL ABC-buffer umiddelbart før bruk.

200 mM DTT: 7,7 mg DTT veies inn og løses i 250 μL ABC-buffer umiddelbart før bruk.

Alkyleringsreagens:

400 mM IAA: 37,2 mg IAA veises inn og løses i 500 μL ABC- buffer umiddelbart før bruk.

800 mM IAA: 37,2 mg IAA veises inn og løses i 250 μL ABC- buffer umiddelbart før bruk.

Trypsin:

1 mg/mL trypsin-stamløsning: 1 mg trypsin løses i 1 mL ABC-buffer umiddelbart før bruk.

10 µg/mL trypsinløsning til klipping av urinprøver: 10 µL trypsin-stamløsning (1 mg/mL) tilsettes 990 µL ABC-buffer.

50 µg/mL trypsinløsning til klipping av serumprøver: 50 µL trypsin-stamløsning (1 mg/mL) tilsettes 950 µL ABC-buffer.

5.2.3 Løsninger til SPE10 % TFA (10 mL):

1 mL 100 % TFA løses i 9 mL ionebyttet vann i en målekolbe. Løsningen er holdbar i 1 måned ved oppbevaring i kjøleskap.

0,1 % TFA (10 mL):

100 µL 10 % TFA tilsettes 9,9 mL ionebyttet vann i en målekolbe. Løsningen er holdbar i 1 uke ved oppbevaring i kjøleskap.

Elueringsløsning – ACN:0,1%TFA (80:20) (1 mL):

800 µL ACN tilsettes 200 µL 0,1 % TFA-løsning umiddelbart før eluering.

20 mM HCOOH:

75 µL 100 % HCOOH tilsettes 100 mL ionebyttet vann. Løsningen er holdbar i inntil 3 måneder ved oppbevaring i kjøleskap.

5.2.4 Løsninger til tillaging av intern standard10 % HCOOH:

50 µL 100 % HCOOH fortynnes i 450 µL ionebyttet vann.

0,1 % HCOOH:

20 µL 10 % HCOOH fortynnes i 1980 µL ionebyttet vann.

5.2.5 Mobilfaser

Mobilfase A består av 20 mM HCOOH og ACN i forhold 95:5 (v/v). Mobilfase B består av 20 mM HCOOH og ACN i forhold 5:95 (v/v). Mobilfase C (50:50 ACN:H₂O) og Mobilfase D (5:95 MeOH:H₂O) benyttes til vask av kolonne etter analyser med høy konsentrasjon av hCG og til purging av systemet før oppstart av en analysesekvens.

20 mM HCOOH: 755 µL 100 % HCOOH tilsettes 1 L ionebyttet vann.

Mobilfase A: 950 mL 20 mM HCOOH blandes med 50 mL ACN.

Mobilfase B: 50 mL 20 mM HCOOH blandes med 950 mL ACN.

Mobilfase C: 250 mL ACN blandes med 250 mL ionebyttet vann.

Mobilfase D: 25 mL MeOH blandes med 475 mL ionebyttet vann.

Mobilfasene ristes godt og settes på ultralydbad i 5-10 minutter for å fjerne luftbobler.

5.3 Tillaging av utstyr

SPE-tipper

6 puter (diameter \approx 1 mm) av Empore C8-sorbent trykkes ut med en glasspasteurpipette og overføres til en 200 µL finntip pipettespiss. En tynn metalltråd brukes til å skyve ut sorbenten fra pasteurpipettespissen og trykke putene forsiktig på plass. Kondisjonerings-, vaske- og prøveløsningen samles opp i et 2,0 mL eppendorfrør med et hull i lokket med plass til pipettespissen. Før eluering overføres SPE-tippen til et 1,5 mL eppendorfrør av LoBind kvalitet med hull i lokket for oppsamling av eluatet. Figur 5-1 viser en ferdiglaget SPE-tipp i et eppendorfrør klar til bruk.



Figur 5-1:
Egenprodusert SPE-
tipp i uthullet
eppendorfrør.

6. Metoder

En studie ble designet og gjennomført med hensyn på deteksjon av hCG i urin og serum. Innsamlede prøver ble analysert ved immunoaffinitets-MS-metoden utviklet, optimalisert og validert av Hanne Lund *et al.* [1-5].

6.1 Studien

Dopingstudien ble gjennomført i den hensikt å vise at immunoaffinitets-MS-metoden egner seg til deteksjon av subkutan administrert hCG i friske frivillige menn, slik at metoden på sikt kan implementeres i WADAs antidopingarbeid.

Studien var blindet og randomisert. Deltakerne ble ved tilfeldig trekking delt i to grupper hvor den ene halvdel fikk én dose Pregnyl[®], mens den andre halvdel fikk én dose Ovitrelle[®]. Urin og serumprøver ble samlet over 14 dager. Før studiestart ble det søkt om godkjenning fra Regional Etisk Komité (REK) (vedlegg 1), sponsormidler fra WADA og det ble tegnet forsikring for deltakerne i legemiddelansvarsforeningen.

6.1.1 Deltakere, studiedesign, intervensjon og prøveinnsamling

Det ble satt som mål å rekruttere minst 20 friske frivillige menn i alderen 18-50 år for å få et tilstrekkelig tallmateriale. Rekrutteringen foregikk ved Farmasøytisk Institutt, Matematisk-naturvitenskapelig fakultet og Medisinsk fakultet ved Universitetet i Oslo og blant venner og kolleger. Rekrutteringen foregikk muntlig i form av presentasjon i auditorier, og skriftlig i form av utsendelse av mail med informasjonsskriv (vedlegg 2).

Før studiestart måtte deltakerne signere samtykkeerklæring (vedlegg 3) på at de var friske, frivillige, ikke aktivt konkurrerende idrettsutøvere, og at de hadde mottatt og lest informasjonsskrivet. Det ble også utdelt urinprøveglass merket med dato og deltagernummer til bruk under studien.

Studien ble utført i samarbeid med et team bestående av leger, bioingeniører og sykepleiere ved Oslo Universitetssykehus, Aker, og bioingeniører på farmakologisk avdeling ved Farmasøytisk Institutt, UiO.

En kortfattet oversikt over studien er gitt i tabell 6.1. På studiens første dag (dag 0) ble det målt to blodtrykk av hver deltaker, hvor det laveste ble oppgitt. Grensen for å være med i

studien ble satt til 160/95. Ved én måling over maksimal grense, ble en tredje måling utført. Hvis det tredje blodtrykket var under grensen, fikk deltakeren bli med i studien. Ved for høy tredjengangs måling ble deltakeren ekskludert fra studien.

Det ble levert morgenurin og avgitt blodprøve, såkalte nullprøver. Nullprøvene skal bekrefte at deltakeren ikke har hCG i kroppen før studiestart. Positiv nullprøve vil være en indikasjon på doping eller kreft hos deltakeren og studielege skal kontaktes for videre undersøkelse og oppfølging.

Etter avgitt blodprøve fikk deltaker selv trekke hvilket hCG-preparat han selv skulle få. Det ble gitt én dose av Pregnyl® eller Ovitrelle®. Injeksjonen ble satt subkutan i mageregionen. Etter injeksjon ble deltaker observert i 30 minutter før han fikk forlate prøvetakningsstasjonen. Dette ble gjort for å sikre at eventuelle allergiske reaksjoner ble oppdaget.

Videre ble det avgitt blodprøver på dag 1, 2, 4, 7, 10 og 14 etter injeksjon, og det ble levert morgenurin for dag 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 og 14 etter injeksjon. Urinprøve for dag 3 ble oppbevart av deltaker i kjøleskap og avlevert på dag 4. Urinprøve for dag 5 og 6 ble oppbevart av deltaker i kjøleskap og avlevert på dag 7. Det ble avgitt to rør à 5 mL blod per deltager ved hver prøvetakning. Eventuelle avvik ble notert i protokoll.

Innsamling av prøvemateriale foregikk i mai 2011, mens analysene ble gjennomført i perioden oktober 2011-april 2012.

Tabell 6.1: Studiedesign.

Hendelse/Dag	0	1	2	3	4	5	6	7	10	14
Måle blodtrykk	x									
Injeksjon av hCG	x									
Urin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Serum	x	x	x		x			x	x	x

6.1.2 Håndtering av prøvene etter prøvetakning og oppbevaring

Urin:

Urinprøver ble allikvotert over i ferdigmerkede 50 mL sentrifugerør og frosset ned.

Serum:

Blodprøvene sto minimum 30 minutter på benk etter prøvetaking før sentrifugering. Dette ble gjort for at blodet skulle få tid til å koagulere. Deretter ble blodprøvene sentrifugert i en Hettich-sentrifuge ved 1660 G i 10 minutter. Etter sentrifugering ligger serum øverst og den koagulerte blodklotten i bunnen av glasset, adskilt av en gel. Serum ble helt over på ferdigmerkede glassrør og frosset ned.

Urin- og serumprøvene ble oppbevart i egen fryser ved -32 °C.

6.2 Immunoaffinitets-MS-metode

Prøvene i denne studien ble analysert med immunoaffinitets-MS-metoden utviklet av Hanne Lund *et al.* [1-5]. Metoden baserer seg på deteksjon av signaturpeptider for fem hCG-isoformer. Kvantifisering av hCG utføres på grunnlag av signaturpeptid for hCG β (β T5). Påvisning av hCG β i serum og/eller urin vil med sikkerhet kunne fastslå doping hos menn, dersom maligne tilstander kan utelukkes. En intern standard ble implementert for hCG β , is β T5. Intern standarden benyttes for å korrigere for eventuell variasjon i massespektrometeret. Metoden er validert for analyse av hCG i både serum og urin [1, 5]. Tabell 6.2 viser LOD og LLOQ for hCG β i henholdsvis urin og serum. Kapittel 6.3-6.5 beskriver immunoaffinitets-MS-metoden i detalj.

Tabell 6.2: LOD og LLOQ for hCG i henholdsvis urin og serum [1, 5].

	Urin	Serum
LOD (IE/L)	2	9
LLOQ (IE/L)	5	29

6.3 Prøveopparbeidelse

Prøveopparbeidelsen er identisk for urin og serum med unntak av konsentrasjon på trypsinløsning tilsatt før klipp.

6.3.1 Klargjøring av dopingprøver før analysestart

Urin:

50 mL sentrifugerør med frosset urin tines på vannbad ved ca. 20 °C. Prøverørene ristes godt på vortexmikser før 5 mL pipetteres over i 15 mL sentrifugerør. Sentrifugerørene sentrifugeres ved 4500 rpm i 5 minutter slik at utfelte partikler i urinen sedimenterer i bunnen.

Serum:

Glassrør med frosset serum tines på benk i romtemperatur.

6.3.2 Immunoekstraksjon med magnetiske kuler

Eppendorfrørene settes i magnet (DynaMagTM-2) før prøveopparbeidelsen starter. Magneten benyttes gjennom hele prosedyren for å skille de magnetiske kulene fra løsningene. Etter hver tilsetning av en løsning ristes eppendorfrørene godt på vortexmikser før de sentrifugeres raskt. Risting på vortexmikser gjøres for å blande kulene godt med løsningen. Rask sentrifugering benyttes for å hindre at kulene sitter fast i lokket på eppendorfrøret etter risting.

1. 500 µL 1*PBS med 0,05 % Tween 20 tilsettes hvert eppendorfrør.
2. 20 µL magnetiske kuler coatet med antistoffet E27 tilsettes hvert rør. Løsningen med de magnetiske kulene ristes godt på vortexmikser mellom hver andre tilsetning. Eppendorfrørene ristes godt, sentrifugeres raskt og vaskeløsningen fjernes.
3. 1 mL urin eller serum tilsettes før prøvene ekstraheres 1 time på HulaMixerTM.
4. Prøvene settes i magnet og prøveløsningen fjernes.
5. De magnetiske kulene vaskes i gitt rekkefølge:
 - 500 µL 1*PBS med 0,05 % Tween 20
 - 500 µL 1*PBS
 - 500 µL Tris-HCl

Mellom hvert vasketrinn ristes eppendorfrørene godt, sentrifugeres raskt og settes i magnet for fjerning av vaskeløsning.

6. 200 µL nylaget ABC-buffer tilsettes.

6.3.3 Trypsinering

1. *Redusering*: 6 μ L 100 mM DTT tilsettes hvert eppendorfrør. Rørene ristes og settes på Thermomixer med lett risting ved 95 °C i 20 minutter.
2. Avkjøl til romtemperatur.
3. *Alkylering*: 9 μ L 400 mM IAA tilsettes hvert eppendorfrør. Rørene ristes og settes mørkt i 15 minutter.
4. *Trypsinering*:
 - URIN: 10 μ L 10 μ g/mL trypsinløsning tilsettes og blandes lett på vortexmikser.
 - SERUM: 10 μ L 50 μ g/mL trypsinløsning tilsettes og blandes lett på vortexmikser.
5. Prøvene settes på Thermomixer med lett risting ved 37 °C i 18 timer.

6.3.4 SPE

Fast-fase-ekstraksjon utføres med egenproduserte SPE-tipper med uthullede eppendorfrør til å samle opp avfallsløsninger og eluat (se avsnitt 5.3 «Tillaging av utstyr»), og sentrifuge. Sentrifugalkraften drar påsatt væske gjennom sorbenten.

1. Kondisjonering:
 - 100 μ L ACN
2. Vask:
 - 100 μ L 20 mM HCOOH
3. Prøvepåsetting:
 - 200 μ L prøve.
4. Vask:
 - 100 μ L 20 mM HCOOH
5. Flytt SPE-tippene over til rene uthullede 1,5 mL LoBind eppendorfrør.
6. Eluering:
 - 60 μ L ACN:0,1 % TFA (80:20)

Mellom hvert trinn sentrifugeres eppendorfrørene med SPE-tipper ved 4500 rpm i 1 minutt eller til all væske har vandret gjennom sorbent. Etter prøvepåsetting sentrifugeres rørene i 2 minutter eller til all prøveløsning har vandret gjennom sorbent.

7. Prøvene settes til inndamping ved 60 °C under N₂-gass i ca. 40 minutter.
8. Prøvene fryses ned eller reløses i 40 μ L 20 mM HCOOH og 10 μ L 50 pmol/mL intern standard dersom de skal analyseres på LC-MS/MS samme dag.

6.4 Intern standard

Det ble benyttet en syntetisert isotopanalogue (AQUA peptid fra Sigma) av signaturpeptid β T5 som intern standard (IS). Isotopanalogen og β T5 har samme aminosyresekvens, men aminosyre nummer én fra c-terminal ende er byttet ut med en 10 Da tyngre isotopanalogue. Det syntetiske peptidet inneholder én cystein-aminosyre som må reduseres og alkyleres slik at β T5 og IS får samme fysikalsk-kjemiske egenskaper. Reduksjon og alkylering ble gjort på følgende måte:

Stamløsning av intern standard (200 μ L, 5 nmol/mL):

1 ampulle (1 nmol tørrstoff) løses i 20 μ L 10 % HCOOH og ristes godt. Deretter tilsettes 180 μ L 0,1 % HCOOH og løsningen ristes forsiktig.

Arbeidsløsning (1 mL, 200 pmol/mL):

1. 40 μ L av stamløsning (5 nmol/mL) tilsettes 940 μ L 200 mM ABC-buffer.
2. *Redusering:* 8 μ L 200 mM DTT tilsettes. Løsningen settes på Thermomixer med lett risting ved 95 °C i 20 minutter. Avkjøles til romtemperatur.
3. *Alkylering:* 12 μ L 800 mM IAA tilsettes. Løsningen settes mørkt i 15 minutter.

Etter at intern standarden har blitt redusert og alkylert, fortynnes arbeidsløsningen til 50 pmol/mL, allikvoterer over i eppendorfrør av LoBind-kvalitet i passende volum og fyses ned.

6.5 Analyse av hCG

Prøvene i denne studien ble analysert ved hjelp av LC-MS/MS. Separasjon er basert på omvendtfasekromatografi, mens detektor er en trippelkvadrupol-MS innstilt i SRM-mode på bestemte overganger.

6.5.1 Oppsett av LC-MS/MS

LC-MS/MS-systemet består av mobilfasereservoar, pumper, blandekammer, autoinjektor, separasjonskolonne og trippelkvadrupol-MS.

6.5.2 HPLC

Kromatografiske parametere:

Mobilfase A:	95 % 20 mM HCOOH : 5 % ACN
Mobilfase B:	5 % 20 mM HCOOH : 95 % ACN
Kolonne:	Biobasic C8; 50 mm x 1 mm i.d., 5 µm partikkelstørrelse
Injeksjonsvolum:	40 µL
Flow:	50 µL/min

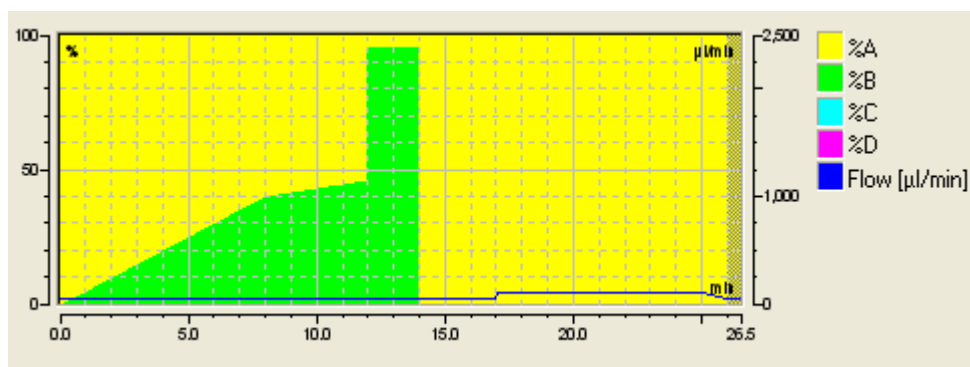
Flow ved rekondisjonering av kolonnen: 100 µL/min

Ved oppstart av LC-MS-systemet gjennomføres purging med 50:50 MFA:MFB og 50:50 MFC:MFD. Autoinjektor vaskes med 5 % MeOH i vann, og kolonnen ekvilibrerer ved å la MFB og MFA med mobilfasehastighet 50 µL/min vandre gjennom kolonne i henholdsvis 15 minutter og 1,5 time.

For å separere ønskede analytter på kortest mulig tid er en gradient utviklet. Endringen i mobilfasesammensetning og flow i løpet av analysetiden er vist i tabell 6.3 og figur 6-1.

Tabell 6.3: Gradient for analyse av hCG. Ved tiden $t=x$ er mobilfasesammensetning og flow som oppgit. Mobilfasesammensetningen endres gradvis i tidsintervallene.

Tid (min)	MFA (%)	MFB (%)	Flow (µL/min)
0	100	0	50
8	60	40	50
12	54	46	50
12,01	5	95	50
14	5	95	50
14,01	100	0	50
17	100	0	50
17,05	100	0	100
25	100	0	100
26	100	0	50



Figur 6-1: Grafisk fremstilling av gradient. x-akse: Tid (minutter). Venstre y-akse: Andel mobilfase (%). Høyre y-akse: Flow (µL/min). Gul: Andel MFA. Grønn: Andel MFB.

6.5.3 MS

MS-parametere:

Ionisering:	ESI – positive mode
Kapillærtemperatur:	270 °C
Sheat gas:	Nitrogen (N ₂)
Sheat gas pressure:	10 units
Tørkegass:	Nitrogen (N ₂)
Hastighet av tørkegass:	5-10 units
CID-energi:	20-30 V
Kollisjonsgass:	Argon
Kollisjonsgasstrykk:	1,7 m Torr
Scanintervall:	0,5 sec/scan

Det er ønskelig at minst mulig forurensninger blir injisert i MS-systemet. Det er derfor benyttet en svitsj-mekanisme mellom LC og MS som er stilt inn slik at kun væskestrøm fra LC ved 5-16 minutter føres inn i ionekilden og videre inn i MS. En slik svitsj-mekanisme kan

benyttes da alle interessante analytter har retensjonstid innenfor gitt tidsintervall. I tidsintervall 0-5 minutter og 16-26 minutter føres væskestrømmen rett til avfallsbeholderen.

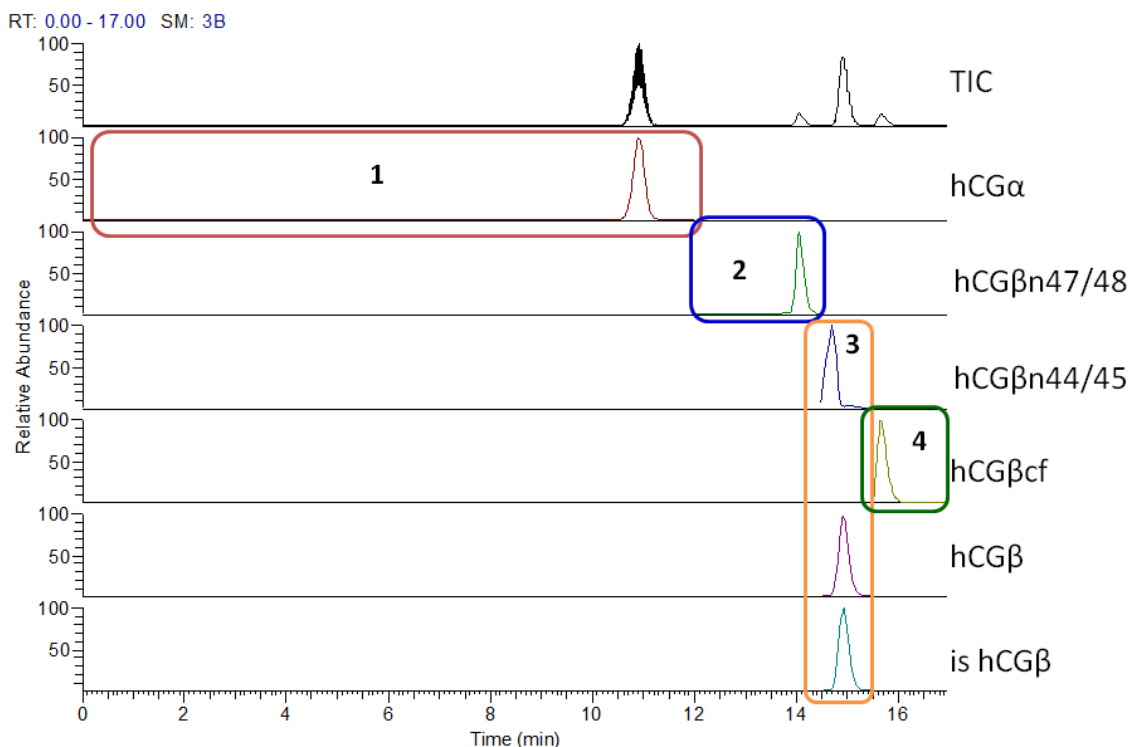
Massespektrometeret analyserer prøvene i SRM-mode. SRM-programmet er delt opp i fire segmenter med m/z-verdier for 1-3 signaturpeptider med tilhørende fragmentioner i hvert segment. Ved å dele opp analysen i ulike segmenter istedenfor å scanne etter alle m/z-verdier samtidig, oppnås høyere sensitivitet. Tabell 6.4 viser m/z-verdi for signaturpeptidene for de ulike hCG-isoformene, samt m/z-verdier for tilhørende fragmentioner.

På grunn av stort prøvemateriale ble det nødvendig å benytte to kolonner, én kolonne til urinprøver og én til serumprøver. Dette ble gjort for å være sikker på at kolonnelevetiden ikke ble overskredet i løpet av en analysesekvens. Retensjonstidene på kolonnene var litt avvikende, og det ble derfor nødvendig å justere segmentene noe, slik at toppene ikke falt utenfor. Tidsintervallene for segmenter på urin- og serumkolonne er vist i tabell 6.4, og figur 6-2 viser hvor i kromatogrammet de ulike segmentene ligger.

Tabell 6.4: SRM-metode benyttet i denne oppgaven. Overganger for ulike signaturpeptider for ulike hCG-isoformer, tidsintervall på segmentene ved analyse av urin- og serumprøver og endring i kollisjonsenergi i q2 i de ulike segmentene.

Scan-segment	Peptidion m/z-verdi	Fragmention m/z-verdi	Signatur-peptid	Tid (min) - Urin	Tid (min) - Serum	Kollisjons-energi (V)
1	409.300	583.400	α T2	0-12.40	0-12.00	20
	414.300	593.400	is α T2 ¹			
2	765.640	519.100	β nT5-47/48	12.40-	12.00-	30
	765.640	659.220		14.70	14.45	
	765.640	1036.300				
3	914.650	1036.300	β nT5-44/45	14.70-	14.45-	30
	914.650	1317.800		15.60	15.45	
	964.200	1036.300	β T5			
	964.200	1317.800				
	969.300	1046.300	is β T5			
	969.300	1327.800				
4	955.670	740.000	β cfT9	15.60-	15.45-	30
	955.670	924.130		17.00	17.00	

¹ Intern standard for α T2 er implementert i metoden, men ble ikke benyttet i denne oppgaven.



Figur 6-2: Scan-segmenter. Boksene markerer hvilke hCG-isoformer som tilhører hvilket scan-segment og hvor i kromatogrammet segmentet ligger.

6.5.4 Standardkurve og QC-prøver

For å kvalitetssikre MS-dataene og muliggjøre kvantifisering av hCG ble det opparbeidet standardkurver og QC-prøver. Standardkurven inneholdt én parallell av hvaer av konsentrasjonene 10, 50, 100, 500 og 750 IE/L, mens QC-prøven hadde konsentrasjon 100 IE/L. Det ble opparbeidet én standardkurve per analyseserie på MS. Denne ble brukt til å kvantifisere hCG i prøvene. I tillegg ble det opparbeidet tilstrekkelig mange QC-prøver slik at det kunne analyseres én QC-prøve per tiende dopingprøve. Dette ble gjort for å vise at signalintensiteten var konstant i massespektrometeret.

6.6 Statistiske beregninger

Analyseresultatene vil bli fremstilt som gjennomsnittlige utskillelsesprofiler med tilhørende error bars for å vise spredningen. Gjennomsnittet (\bar{x}) er basert på deltakerne i samme preparat-gruppe og er beregnet etter følgende formel:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i$$

Spredningen er oppgitt som standardfeil ($SE_{\bar{x}}$). Standardfeilen er standardavviket til gjennomsnittet og er beregnet etter følgende formel:

$$SE_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

hvor standardavviket, s, er:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Alle beregninger samt grafer med utskillelsesprofiler er utført og laget i Excel[®]. Figurene som viser spredning for konsentrasjoner målt på dag 1 etter injeksjon er laget i GraphPad[®].

7. Resultater og diskusjon

7.1 Deltakere

25 deltakere ble rekruttert til studien. Gjennomsnittsalderen på deltagerne var 26,8 år. Én ble ekskludert fra studien på grunn av høyt blodtrykk. De resterende 24 deltakerne fullførte studien. Én deltaker besvimte etter injeksjon. Etter konsultasjon med studielege og av egen vilje fullførte deltageren studien. Det ble samlet inn 237 urinprøver og 167 blodprøver (tabell 7.1)

Tabell 7.1: Oversikt over deltakerne med hensyn på alder, antall prøver som ble avgitt og hvilket hCG-preparat deltakerne fikk. I bunnen av tabellen er gjennomsnittsalder samt sum av antall prøver innsamlet under studien oppgitt.

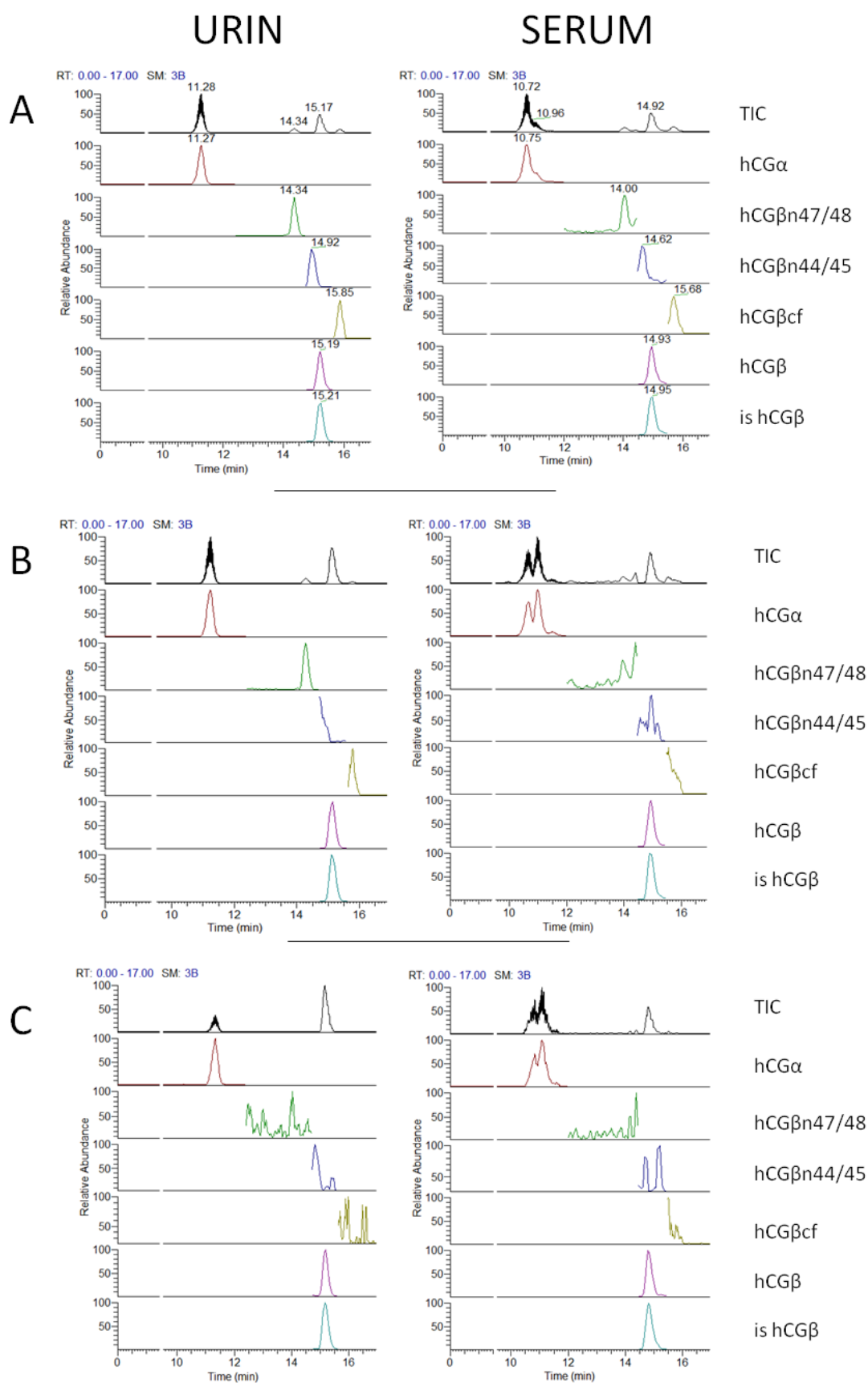
Deltaker	Alder	Antall urinprøver	Antall serumprøver	Legemiddel Pregnyl®/Ovitrelle®
1	21	10	7	P
2	19	10	7	P
3	23	10	7	O
4	35	10	7	O
5	25	10	7	P
6	22	10	7	P
7	21	10	7	O
8	28	10	7	P
9	26	10	7	P
10	25	10	7	P
11	29	10	7	O
12	26	9	7	O
13	26	10	7	P
14	43	10	7	O
15	32	10	7	P
16	25	10	7	O
17	23	10	7	P
18	27	9	7	P
19	23	10	7	P

Deltaker	Alder	Antall urinprøver	Antall serumprøver	Legemiddel Pregnyl®/Ovitrelle®
20	39	10	7	O
21	Ekskludert fra studie grunnet høyt blodtrykk			
22	39	10	7	O
23	19	10	7	O
24	19	9	6	O
25	29	10	7	O
Gjennomsnitt	26,8			12/12
Totalt antall innsamlede prøver		237/240	167/168	

7.2 Analyse av studieprøver

Innsamlede prøver ble analysert med immunoaffinitets-MS-metoden utviklet, optimalisert og validert av Hanne Lund *et al.* [1-5]. Det ble laget én standardkurve for hver analyseserie på LC-MS/MS. Denne ble benyttet til kvantifisering av hCG β hos deltakerne i den samme analyseserien. Regresjonslinjen fremkom ved å plote standarder med konsentrasjon 10, 50, 100, 500 og 750 IE/L mot forholdet i signalintensitet mellom hCG β og is β T5. Standardkurvene for de ulike dagene hadde r^2 -verdier i intervallet 0,988-0,999 og 0,980-0,999 for henholdsvis urin og serum. I standardkurvene som ble benyttet til kvantifisering av hCG β i urin for deltaker 16-20 og 22, og serum for deltaker 13-25, ble punktet 750 IE/L utelatt da punktet avvek fra regresjonslinjen. Ved å utelate dette punktet ble QC-prøvene nærmere sin sanne verdi. R^2 -verdiene for regresjonslinjen uten punktet 750 IE/L var $>0,999$ for både urin og serum. Dette kunne gjøres da ingen analyserte prøver hadde konsentrasjon over 500 IE/L.

Figur 7-1 viser kromatogrammer for (A) tillagede standarder med konsentrasjon 500 IE/L, (B) dag 1 etter injeksjon av Pregnyl® og (C) dag 1 etter injeksjon av Ovitrelle®. Standardprøvene indikerer at metoden kan detektere alle isoformer i både urin og serum. X-aksen i kromatogrammene er avkuttet mellom 1,5 og 9,5 minutter da ingen topper eluerer i dette tidsintervallet. TIC i de ulike kromatogrammene viser at det forekommer mer forurensning i serum enn i urin. hCG α eluerer sammen med en kjent forurensning i serumprøvene. Det er derfor ikke mulig å si noe om utskillelsen av hCG α i serumprøvene i denne studien.



Figur 7-1: Utvalgte kromatogrammer for urin- og serumprøver. **A:** Positiv kontroll. Spiket standardprøve (500 IE/L) i urin og serum med retensjonstider. **B:** Én dag etter injeksjon av Pregnyl[®] hos deltaker 1. **C:** Én dag etter injeksjon av Ovitrelle[®] hos deltaker 12.

7.2.1 Utskillelsesprofiler

Resultatene av studien vil bli fremvist som utskillelsesprofiler. Resultatene er delt inn etter matriks og type hCG-preparat. For hCG β vil det bli vist gjennomsnittsprfiler av deltagerne med tilhørende standardfeil ($SE_{\bar{x}}$). I de samme grafene er kvantifiseringsgrense (LLOQ) for hCG β vist med stiplet linje. I utskillelsesprofilene fra serum er i tillegg deteksjonsgrensen (LOD) vist med prikket linje.

Utskillelsesprofil for hCG α vil bli vist i egen graf, men sammenliknet med utskillelsesprofil for hCG β . Dette gjøres for å vise at hCG α og hCG β følger samme profil og elimineres fra matriks samtidig. Det vil bli vist enkelte deltakeres utskillelsesprofiler av isoformene hCG β n47/48, hCG β n44/45 og hCG β cf for å synliggjøre variasjonen mellom deltakerne. Utskillelse av isoformer lar seg ikke generalisere. Signalresponsen for hCG α , hCG β og isoformene er korrigert for variasjon i analyseinstrumentet ved hjelp av intern standard, is β T5.

Tabell 7.2 gir en skjematisk oversikt over hCG β -konsentrasjon målt én dag etter injeksjon av hCG, siste påvisningsdag og isoformer som kan detekteres etter injeksjon av de respektive preparatene i urin og serum. Konsentrasjon én dag etter injeksjon er oppgitt som gjennomsnitt, mens siste påvisningsdag er oppgitt med median som mål på sentrum.

Tabell 7.2: Skjematisk oversikt over matriks, preparat, hCG β -konsentrasjon én dag etter injeksjon (gjennomsnitt \pm standardfeil), siste påvisningsdag (median (tidligste observerte siste påvisningsdag-seneste observerte siste påvisningsdag)) av hCG β og hvilke isoformer som ble detektert.

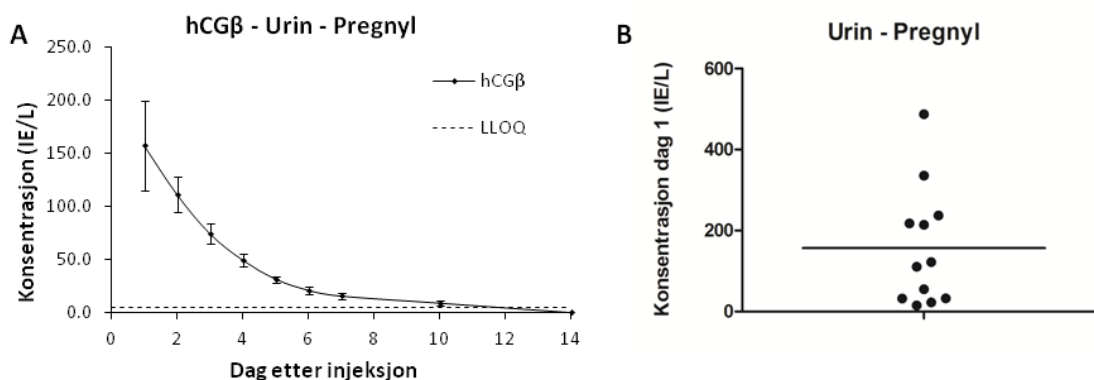
Matriks	Preparat	Konsentrasjon hCG β \pm $SE_{\bar{x}}$ én dag etter injeksjon (IE/L)	Siste dag for påvisning av hCG β	Isoformer
Urin	Pregnyl [®]	157 \pm 42	10 (7-10)	hCG β n47/48, hCG β n44/45, hCG β cf
	Ovitrelle [®]	128 \pm 37	10 (6-14)	hCG β n44/45, hCG β cf
Serum	Pregnyl [®]	144 \pm 20	7 (7-10)	Ingen
	Ovitrelle [®]	133 \pm 11	7 (4-10)	Ingen

Individuelle utskillelsesprofiler av hCG α , hCG β og isoformer i urin, utskillelsesprofil for hCG i urin og serum, samt informasjon om deltakerne følger i vedlegg 4.

URIN:

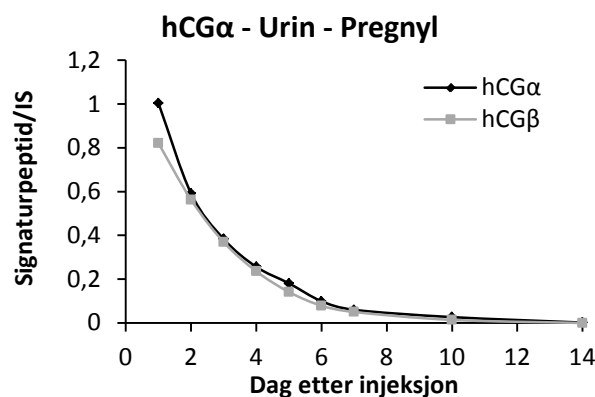
Pregnyl[®]:

Figur 7-2A viser hvordan hCG β etter injeksjon av Pregnyl[®] skilles ut og detekteres i urin. hCG β ble påvist fra dag 1 til og med dag 10 etter injeksjon hos elleve av tolv deltakere, mens hos én deltaker ble hCG β kun påvist til og med dag 7. Det ble ikke gjort funn i urin på dag 14. Konsentrasjonene målt på dag 1 varierte fra 15 til 487 IE/L (figur 7-2B). Dette ga et gjennomsnitt på 157 IE/L med standardfeil ± 42 (tabell 7.2). Standardfeilen avtar ved økende antall dager etter injeksjon. hCG β er fullstendig eliminert en gang mellom dag 10 og 14. På et gitt tidspunkt mellom dag 10 og 14 krysser grafen kvantifiseringsgrensen. Etter dette tidspunktet kan ikke metoden benyttes til kvantifisering av hCG.



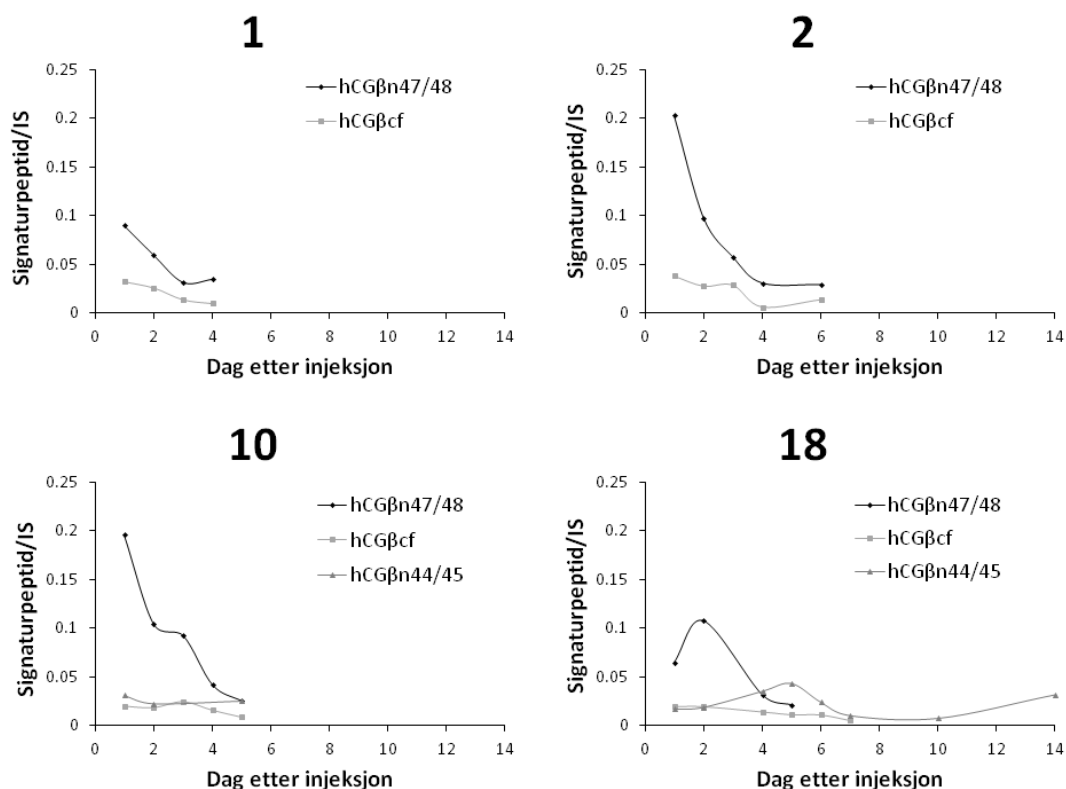
Figur 7-2: **A:** Utskillelsesprofil av hCG β i urin etter injeksjon av Pregnyl[®] (gjennomsnitt \pm SE $_{\bar{x}}$). Stiplet linje markerer LLOQ for analyse av hCG i urinprøver. **B:** Spredningen i konsentrasjonene målt én dag etter injeksjon av Pregnyl[®]. Heltrukket linje indikerer gjennomsnittet i gruppen.

Figur 7-3 viser utskillelsesprofilen for den uspesifikke hCG-subenheten, hCG α , i urin etter injeksjon av Pregnyl[®]. Åtte av tolv deltakere fikk påvist hCG α til og med dag 10, tre deltakere fikk påvist hCG α til og med dag 14, mens én deltaker kun fikk påvist hCG α til og med dag 7. hCG α følger tilnærmet samme utskillelsesprofil som hCG β .



Figur 7-3: Gjennomsnittlig utskillelsesprofil av hCGα og hCGβ i urin etter injeksjon av Pregnyl®.

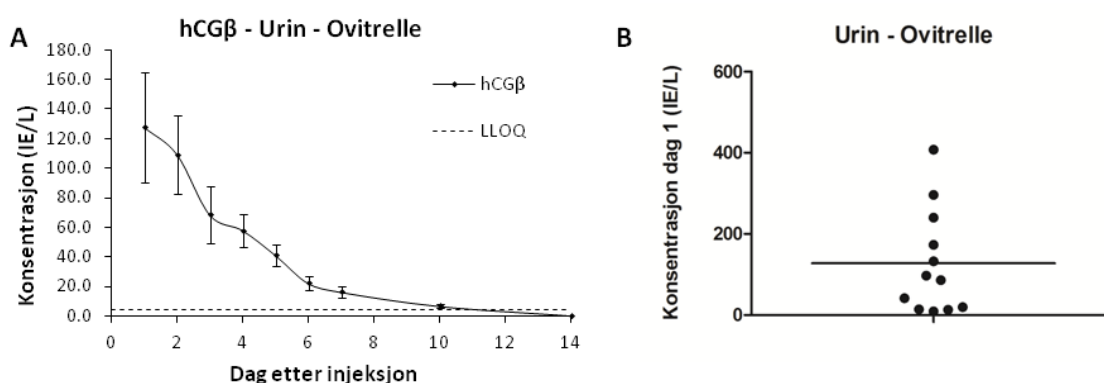
De tre isoformene hCGβn47/48, hCGβn44/45 og hCGβcf viser stor variasjon i signalintensitet og utskillelsesprofil. Det er derfor istedenfor et gjennomsnitt av de ulike isoformene, vist utskillelsesprofil for fire deltakere i Pregnyl®-gruppen (figur 7-4). hCGβn47/48 ble detektert i urin hos alle deltakerne og viser utskillelsesprofil tilnærmet lik hCGα og hCGβ. hCGβcf ble også påvist hos alle deltakere i gruppen, men med en noe flatere kurve. hCGβn44/45 ble kun påvist sporadisk hos enkelte deltakere.



Figur 7-4: Fire utskillelsesprofiler av isoformer hos deltakere som fikk injisert Pregnyl®.

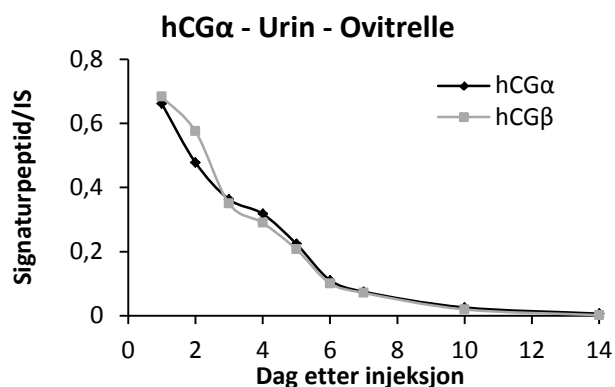
Ovitrelle®:

Figur 7-5A viser gjennomsnittlig utskillelsesprofil for hCG β for gruppen som fikk Ovitrelle®. Én deltaker fikk påvist hCG β til og med dag 6, sju fikk påvist hCG β til og med dag 10 av studien, og tre deltagere fikk påvist hCG β til og med dag 14. Hos den siste deltakeren ble hCG β påvist på dag 10, men urinprøve ble ikke avgitt for dag 14. Høyeste konsentrasjon målt på dag 1 var 408 IE/L, mens laveste konsentrasjon ble målt til 9 IE/L (figur 7-5B). Dette ga et gjennomsnitt på 128 IE/L med standardfeil ± 37 (tabell 7.2). Kurven for utskillelse av hCG β krysser LLOQ en gang mellom dag 10 og 14. Etter dette tidspunktet kan ikke metoden benyttes til kvantifisering av hCG.



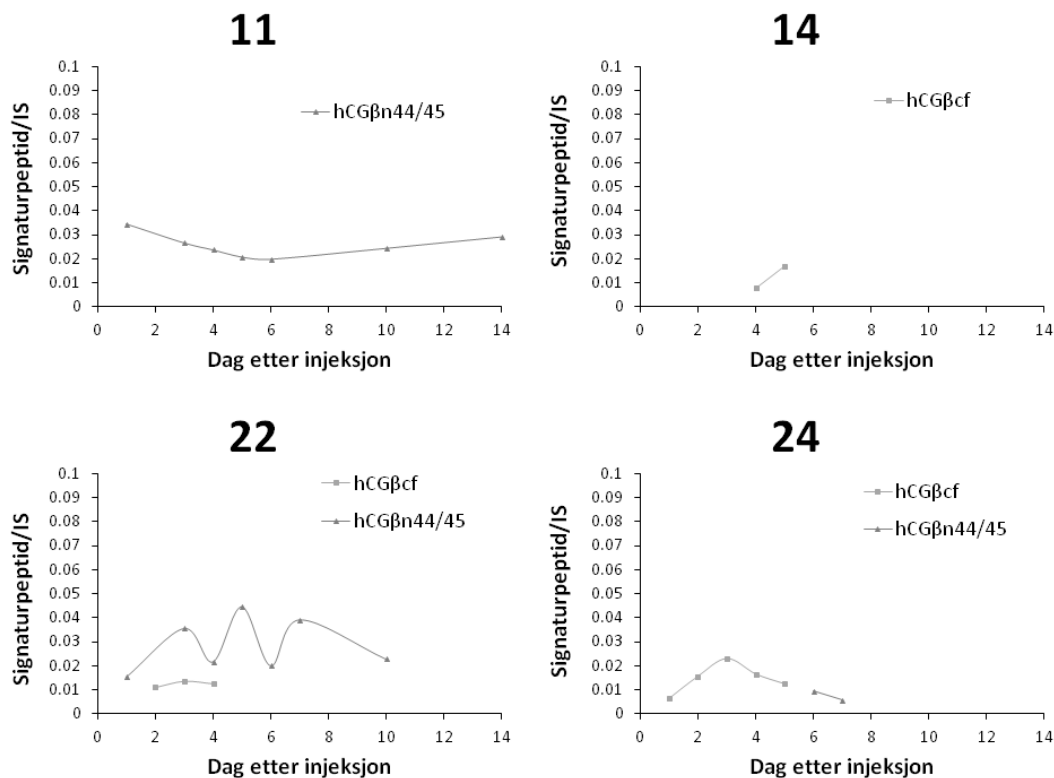
Figur 7-5: **A:** Utskillelsesprofil av hCG β i urin etter injeksjon av Ovitrelle® (gjennomsnitt \pm SE_x). Stiplet linje markerer LLOQ for analyse av hCG i urinprøver. **B:** Spredningen i konsentrasjonene målt én dag etter injeksjon av Ovitrelle®. Heltrukket linje indikerer gjennomsnittet i gruppen.

Gjennomsnittlig utskillelsesprofil for hCG α i urin etter injeksjon av Ovitrelle® er vist i figur 7-6. Hos fem deltakere ble hCG α detektert til og med dag 14, mens hos seks deltakere ble hCG α detektert til og med dag 10. Hos den siste deltakeren ble hCG α detektert på dag 10, mens urinprøve for dag 14 ikke ble avgitt. hCG α følger tilnærmet samme profil som hCG β .



Figur 7-6: Gjennomsnittlig utskillelsesprofil av hCG α og hCG β i urin etter injeksjon av Ovitrelle®.

Etter injeksjon av Ovitrelle® ble varierende grad og mengde av de ulike isoformene detektert. hCGβn47/48 ble ikke påvist hos noen deltakere i denne gruppen. Figur 7-7 gir et inntrykk av isoformdiversiteten i urin etter injeksjon av Ovitrelle®.



Figur 7-7: Fire utskillelsesprofiler av isoformer fra deltakere i gruppen som fikk Ovitrelle®.

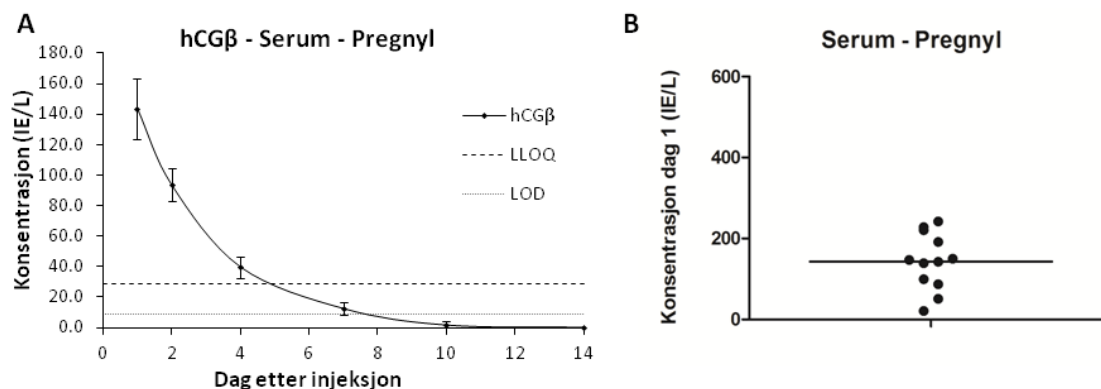
SERUM:

Som tidligere nevnt vil ikke utskillelsesprofil for hCGα i serum bli gjengitt grunnet interferens av kjent forurensning i kromatogrammene. De to nickede variantene av hCGβ og hCGβcf detekteres ikke i serum.

Pregnyl®:

Figur 7-8A viser utskillelsesprofil for hCGβ i serum for gruppen som fikk Pregnyl®. Hos tre deltakere ble hCGβ detektert til og med dag 10, mens hos ni deltakere ble hCGβ kun detektert til og med dag 7. Det ble ikke påvist hCGβ i serumprøver fra dag 14. Høyeste konsentrasjon målt på dag 1 var 242 IE/L, mens laveste konsentrasjon ble målt til 21 IE/L (figur 7-8B). Dette ga en gjennomsnittskonsentrasjon på 144 IE/L med variasjon målt i standardfeil på ± 20 (tabell 7.2). Gjennomsnittprofilen krysser kvantifiseringsgrensen mellom dag 4 og 6. Selv

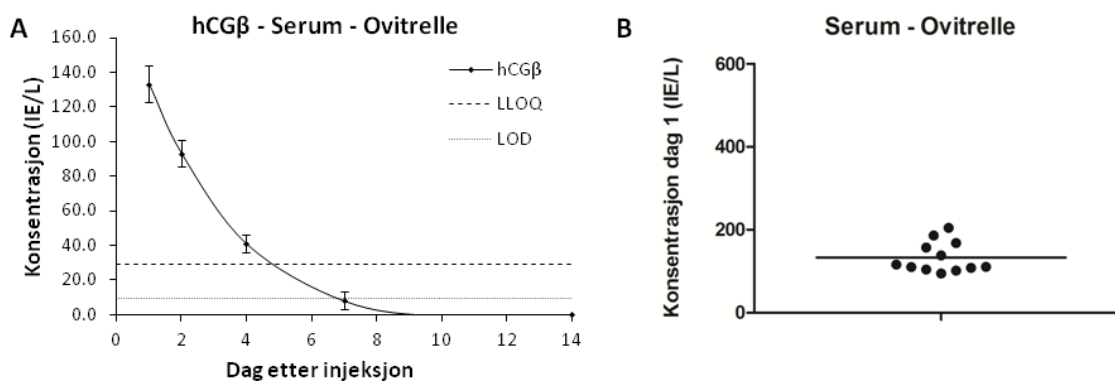
om hCG β påvist etter dette tidspunktet ikke kan brukes til kvantifisering med denne metoden, gir påvisningen en indikasjon på at hCG β er til stede flere dager etter nådd kvantifiseringsgrense.



Figur 7-8: **A:** Utskillelsesprofil av hCG β i serum etter injeksjon av Pregnyl[®] (gjennomsnitt \pm SE $_{\bar{x}}$). Stiplet og prikket linje markerer henholdsvis LLOQ og LOD for analyse av hCG β i serum. **B:** Spredningen i konsentrasjonene målt én dag etter injeksjon av Pregnyl[®]. Heltrukket linje indikerer gjennomsnittet i gruppen.

Ovitrelle[®]:

Figur 7-9A viser gjennomsnittlig utskillelsesprofil av hCG β i serum for deltakerne i gruppen som fikk Ovitrelle[®].



Figur 7-9: **A:** Utskillelsesprofil av hCG β i serum etter injeksjon av Ovitrelle[®] (gjennomsnitt \pm SE $_{\bar{x}}$). Stiplet og prikket linje markerer henholdsvis LLOQ og LOD for analyse av hCG β i serum. **B:** Spredningen i konsentrasjonene målt én dag etter injeksjon av Ovitrelle[®]. Heltrukket linje indikerer gjennomsnittet i gruppen.

Høyeste konsentrasjon på dag 1 ble målt til 205 IE/L, mens laveste individuelle konsentrasjon ble målt til 95 IE/L (figur 7-9B). Dette ga et gjennomsnitt på 133 IE/L med standardfeil \pm 11 (tabell 7.2). Hos to deltakere ble siste påvisning av hCG β gjort dag 4, hos åtte deltakere på

dag 7 og hos to deltakere på dag 10. Utskillelsesprofilen krysser LLOQ en gang mellom dag 4 og 6. Etter dette tidspunktet kan ikke hCG β kvantifiseres. hCG β er likevel detektert frem til og med dag 7 og 10 for enkelte deltakere.

7.2.2 Nullprøve; blank serum og urin

Det ble avgitt urin og blodprøve på studiens første dag før deltaker fikk injeksjon av hCG. Denne prøven var en såkalt nullprøve som skulle vise om deltakeren hadde hCG i kroppen før injeksjon av et hCG-preparat. Hos deltaker 1 ble det påvist små mengder hCG β i urin-nullprøven. Det ble ikke påvist hCG β i serum-nullprøven eller i prøvene fra dag 14. Det konkluderes dermed at operatør har forurensset prøvene under prøveopparbeidelse. Hos deltaker 2 ble det påvist hCG β i serum-nullprøven men ikke i urin-nullprøvene eller ved prøvene tatt på dag 14. Det konkluderes derfor med at deteksjon av hCG i serum-nullprøven skyldes operatørfeil. De resterende nullprøvene var blanke.

7.2.3 Kinetiske betraktninger

Forhåndsestimert kinetikk i serum:

Før studiestart ble det gjort et estimat på forventet utskillelsesprofil for én dose Ovitrelle[®] og Pregnyl[®] i serum på grunnlag av opplysninger i preparatomtalen til de respektive preparatene [39, 40]. Estimert utskillelsesprofil for preparatene i serum er gjengitt i figur 7-10 og tallgrunnlaget for estimeringen er gjengitt i tabell 7.3. Det ble antatt en-kompartmentsmodell da hCG er et stort protein som skilles ut via nyrene. Biotilgjengelighet og distribusjonsvolum ble antatt likt for Pregnyl[®] som for Ovitrelle[®] på grunn av mangelfull informasjon om Pregnyl[®]. Følgende formler ble benyttet til estimering av utskillelse av hCG:

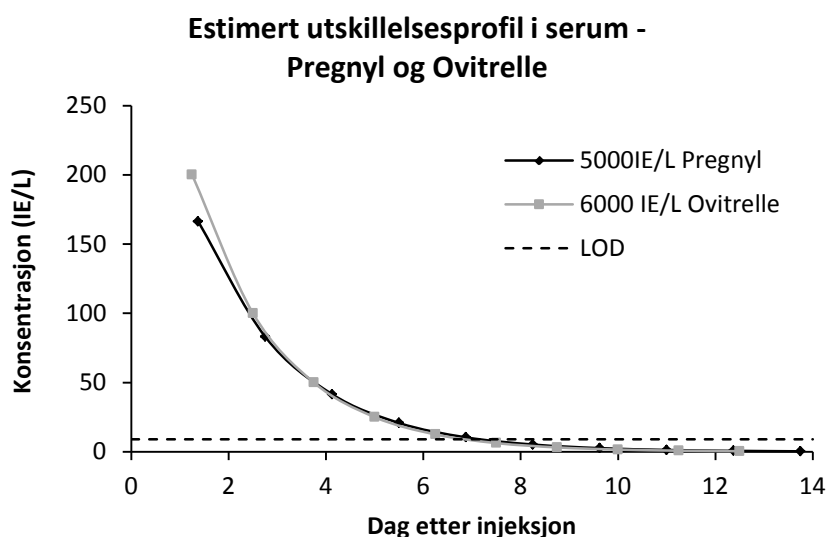
$$\text{Makskonsentrasjon } (C_{\max}) = \frac{\text{Dose} \times \text{Biotilgjengelighet}}{\text{Distribusjonsvolum}}$$

$$\text{Konsentrasjon i serum} = C_{\max} \times \left(\frac{1}{2}\right)^{\text{Antall halveringstider}}$$

Tabell 7.3: Tallgrunnlag for estimering av utskillelsesprofil for Pregnyl® og Ovitrelle® i serum etter én dose injisert.

Parameter	Enhet	Pregnyl®	Ovitrelle®
Dose	IE	5000	6000
Biotilgjengelighet	%	40 ¹	40
Halveringstid	timer	33	30
Distribusjonsvolum	L	6 ¹	6
Estimert C _{max}	IE/L	333,3	400

¹ Antatt likt som for Ovitrelle® på grunn av manglende opplysninger for Pregnyl®.

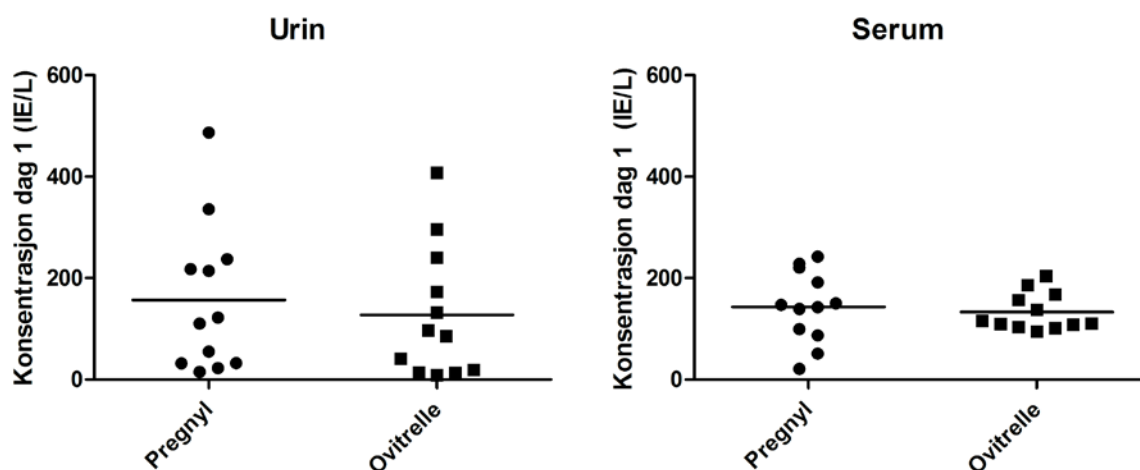


Figur 7-10: Forhåndsestimert utskillelsesprofil for Pregnyl® og Ovitrelle® i serum. Stiplet linje angir LOD for analyse av hCG i serum.

Etter én halveringstid er estimert konsentrasjon i serum 166 og 200 IE/L for henholdsvis Pregnyl® og Ovitrelle®. Begge preparatene er estimert til å nå LOD rundt dag 6-7 etter injeksjon gitt at LOD er 9 IE/L i serum. Det er rimelig å anta en noe lengere deteksjonstid i urin, da urin er hovedutskillelsesvei for hCG, samt at hCG vil oppkonsentreres og lagres i blæren før urin skilles ut.

Konsentrasjon én dag etter injeksjon:

I urin ble gjennomsnittlig konsentrasjon én dag etter injeksjon av henholdsvis Pregnyl® og Ovitrelle® beregnet til 157 og 128 IE/L, mens i serum ble konsentrasjonen for de respektive preparatene beregnet til 144 og 133 IE/L (tabell 7.2). Figur 7-11 viser spredningen av målingen rundt gjennomsnittet for de ulike preparatene i de ulike matriksene.



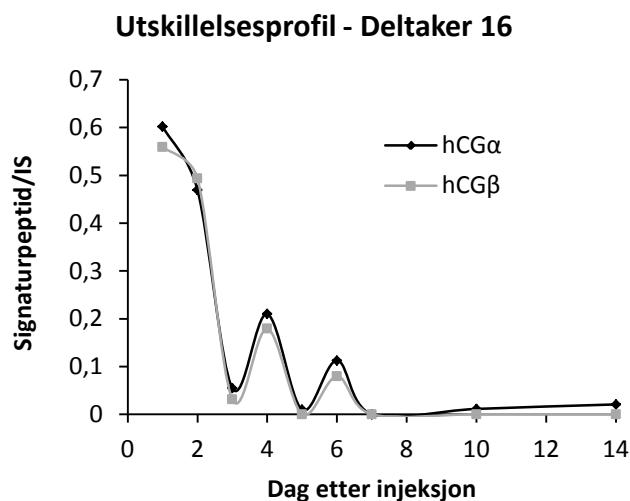
Figur 7-11: Spredning om gjennomsnittet én dag etter injeksjon av Pregnyl® og Ovitrelle® i urin og serum. Heltrukket linje representerer gjennomsnittet i gruppen.

Gjennomsnittlig konsentrasjon én dag etter injeksjon ligger noe lavere enn estimert. Dette kan skyldes antagelsen som ble gjort om at hCG kan beskrives med en en-kompartimentmodell. Virkelighetene er sannsynligvis ikke like enkel, men antagelsen gir et godt bilde, og som figur 7-2, 7-5, 7-8 og 7-9 viser, følger faktiske utskillelsesprofiler samme kurve som estimerte.

Urin:

Variasjon i konsentrasjon av hCG ved dag 1 i urin kan ha flere årsaker, men hovedgrunnen er hvor oppkonsentrert urinen er. Deltakerne ble oppfordret til å avgi morgenurin. Morgenurin er den mest konsentrerte urinen, da alt nødvendig vann har blitt reabsorbert i tubulussystemet og urinen har blitt lagret i urinblæren over natt. Analyse av morgenurin vil derfor gi høye og varierende konsentrasjoner. Konsentrasjonen av morgenurin vil blant annet avhenge av hvor mye som ble drukket kvelden før, dobesøk kvelden i forveien, dobesøk i løpet av natten etc. I tillegg kan det heller ikke utelukkes at en eller flere deltakere kan ha glemt å samle opp morgenurin, og heller avlevert en urinprøve tatt senere på dagen.

Utskillelsesprofil for deltaker 16 er gjengitt i figur 7-12 og viser hvor utslagsgivende grad av oppkonsentrasjon av urin kan være. Under prøveopparbeidelsen ble det registrert at noen av urinprøvene fra deltakeren var veldig lyse i forhold til andre. Etter analyse ble det bekreftet at lys urin korrelerte med lave konsentrasjoner (dag 3 og 5).



Figur 7-12: Eksempel på utskillelsesprofil hvor grad av oppkonsentrasjon av urin er avgjørende for resultatet.

Det er mulig å korrigere for konsentrasjonsforskjeller i urin ved hensyn av kreatininjustering, men dette ble ikke gjort i denne oppgaven. Variasjonen i målingene utliknes ved at deltakerantallet er tilstrekkelig stort. Gjennomsnittsverdier for urin korrelerer godt med gjennomsnittsverdier for serum samt estimeringen av hCG i serum som ble gjort før studiestart.

Et annet konsentrasjonsrelatert problem dukket opp under prøveopparbeidelsen. Konsentrert urin (mørk urin) hadde en tendens til å avmagnetisere kulene etter miksing på HulaMixerTM og under vaskeprosedyren (figur 7-13). Dette førte til at noen kuler med potensielt bundet hCG, ble fjernet sammen med prøveløsning og vaskeløsninger. Hva det skyldes vites ikke, men det antas at konsentrert urin inneholder mye ioner eller andre substanser som på en eller annen måte kan maskere kulenes magnetiske egenskaper. For hvert vasketrinn ble de magnetiske egenskapene noe bedre.



Figur 7-13: Eksempel på hvordan kulene ser ut til å miste sine magnetiske egenskaper. I rør nummer 5 og 6 fra venstre foreligger en stor andel av kulene i løsning til tross for at disse rørene har stått like lenge i magnet som de seks andre rørene. Hvert rør inneholder 20 μ L magnetiske kuler og 1 mL urin.

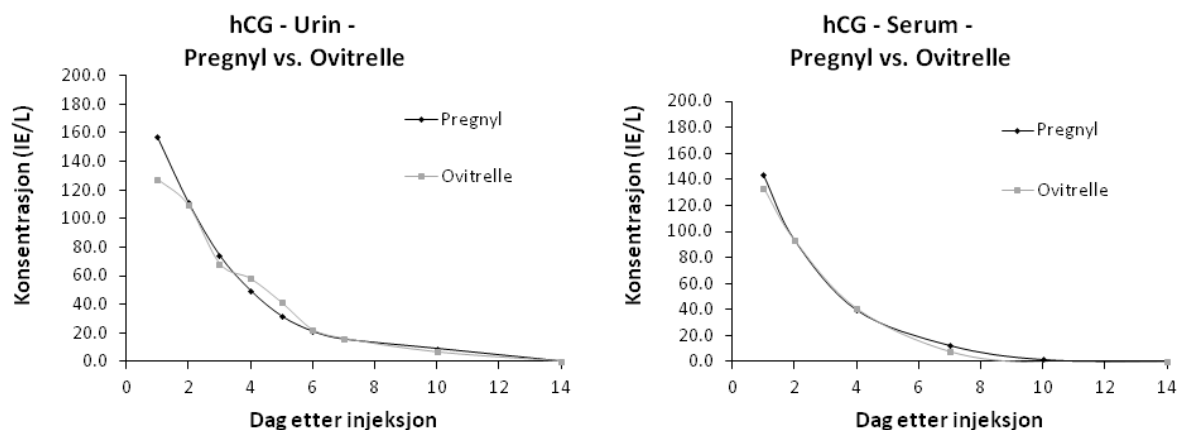
Halvparten av deltakerne, fem i Pregnyl[®]- og sju i Ovitrelle[®]-gruppen, hadde lavere konsentrasjonsmålinger på dag 1 enn ved dag 2 i urin. Om dette skyldes grad av oppkonsentrert urin eller individuelle metabolismevariasjoner vites ikke.

Serum:

Pregnyl[®] utviser noe større grad av variasjon av konsentrasjon i serum på dag 1 etter injeksjon enn Ovitrelle[®]. Dette kan skyldes at Pregnyl[®] er et preparat bestående av uhCG med noe batch-til-batch variasjon i sammensetning av isoformer. Ovitrelle[®] inneholder kun intakt hCG i rekombinant form og preparatet har dermed ikke batch-til-batch variasjon.

Hvor lenge kan hCG α og hCG β detekteres?

Analyseresultatene viser at hCG α og hCG β detekteres til og med dag 7 i serum og dag 10 i urin for begge preparatene, men med noe interindividuell variasjon. Dette stemmer godt overens med estimert deteksjonslengde som i serum ble beregnet til dag 6-7 etter injeksjon. I figur 7-14 er gjennomsnittlig utskillelsesprofil for Pregnyl[®] og Ovitrelle[®] sammenliknet i samme matriks. Figuren viser at preparatene følger tilnærmet samme profil og at de kan detekteres like lenge i samme matriks.



Figur 7-14: Sammenlikning av utskillelsesprofiler av Pregnyl® og Ovitrelle® i samme matriks.

Isoformer:

Etter én injeksjon av Pregnyl® eller Ovitrelle® observeres ikke isoformene hCGβn47/48, hCGβn44/45 og hCGβcf i serum og sees kun initielt og i varierende grad i urin. Dette stemmer godt med litteraturen som beskrevet i avsnitt 4.2.4 «Metabolisme». Isoformer er svært vannløselige og skilles raskt ut fra blod. Ved gjentatte injeksjoner kan isoformene muligens detekteres i større grad i urin. Ved endogen produksjon av hCG i forbindelse med svangerskap eller maligne tilstander kan isoformer påvises i begge matrikser. I disse tilfellene er det snakk om produksjon av hCG som gir svært høye konsentrasjoner i begge matrikser. Dette er ikke tilfelle etter én enkelt injeksjon av hCG i form av Pregnyl® eller Ovitrelle®.

7.2.4 Er det mulig å skille mellom uhCG (Pregnyl®) og rhCG (Ovitrelle®)?

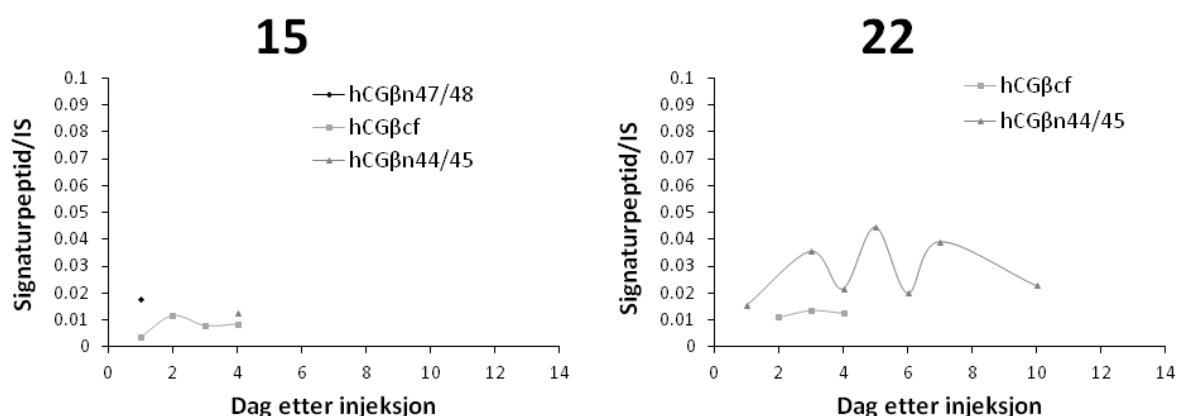
Pregnyl® består av intakt hCG samt degraderingsprodukter, mens Ovitrelle® består av intakt rekombinant hCG.

Dopingstudien ble designet som en enkeltblindet studie hvor analytikeren ikke visste hvilket preparat den enkelte deltaker hadde fått. Nøkkelen ble først åpnet etter at alle prøver var analysert, data tolket og et forslag over hvem som hadde fått hvilket preparat var satt opp (tabell 7.4). Forslaget ble basert på urinprøvene da det ikke var mulig å se en forskjell i serumprøvene. Deltakerne ble inndelt i to grupper etter hva slags isoformer som ble detektert i urin. Hos halvparten av deltakerne ble hCGβn47/48 og hCGβcf påvist. Den andre gruppen inneholdt deltakere hvor isoformene ble detektert mer sporadisk uten noe fast mønster. Tabell 7.4 viser at ved å kategorisere deltakerne etter grad av isoformer i urin ble det i 22 av 24

tilfeller konkludert rett. Figur 7-15 viser deteksjon av isoformer hos de to deltakerne hvor feil konklusjon ble trukket.

Tabell 7.4: Forslag og fasit over hvilken deltaker som fikk hvilket preparat.

Preparat	Forslag (Deltaker nr.)	Fasit (Deltaker nr.)
Pregnyl®	1,2,5,6,8,9,10,13,17,18,19, 22	1,2,5,6,8,9,10,13, 15 ,17,18,19
Ovitrelle®	3,4,7,11,12,14, 15 ,16,20,23,24,25	3,4,7,11,12,14,16,20,23, 22 ,24,25



Figur 7-15: Utskillelse av isoformer i urin hos deltaker 15 (Pregnyl®) og 22 (Ovitrelle®).

Hos deltaker 15 som feilaktig ble innlemmet i Ovitrelle®-gruppen ble hCGβn47/48 påvist kun på dag 1, mens hos de andre i Pregnyl®-gruppen ble denne isoformen påvist i 4-6 dager. Hos deltaker 22 ble hCGβn44/45 detektert i 10 dager, mens hCGβn47/48 ikke ble detektert i det hele tatt. Deltaker 22 kan ikke ha fått Pregnyl® da den nickede varianten hCGβn47/48 ikke ble detektert i urinen. Denne antagelsen gjelder etter injeksjon av én dose Pregnyl® eller Ovitrelle®. Ved gjentatt dosering over tid kan deteksjon av isoformer være annerledes.

Studien viste at det er mulig å skille mellom Pregnyl® og Ovitrelle® i urin, men ikke i serum, etter én injeksjon av de respektive preparatene. Tilstedeværelse eller fravær av hCGβn47/48 indikerte hvilket preparat deltakeren hadde fått. Dette er derimot ikke relevant i dopingsammenheng, da det i dopinganalyser kun er nødvendig å påvise bruk.

7.2.5 Hvilken matriks egner seg best for deteksjon av hCG i doping?

I dag benyttes urin som matriks når utøvere skal testes for hCG. Kravet til testing er at to ulike immunometriske tester som hver har nedre deteksjonsgrense på minst 5 IE/L skal utføres ved et WADA-akkreditert laboratorium [15]. I denne oppgaven ble serum- i tillegg til urinprøver analysert for å undersøke om deteksjon av hCG i serum kan gi mulighet for å skille mellom endogent og rekombinant hCG. Analyseresultatene viste at det ikke ble funnet forskjell i serumprofiler opparbeidet fra Pregnyl®- og Ovitrelle®-deltakerne. Det ble derimot bestemt at hCG etter én injeksjon kan detekteres noe lenger i urin enn serum, henholdsvis 10 mot 7 dager, uavhengig av preparat. Dette er et godt argument for å benytte urin istedenfor serum under dopingkontroll.

Et annet argument for ikke å benytte serum som prøvematriks, er den noe høyere kvantifiserings og deteksjonsgrensen som skyldes større grad av forurensninger i serum. Per i dag er ikke denne metoden tilstrekkelig sensitiv for å kunne benyttes til analyse av serumprøver i dopingsammenheng da LOD er validert til 9 IE/L. WADA krever nedre deteksjonsgrense på minst 5 IE/L.

Et siste argument som gjør at urin egner seg bedre enn serum som prøvematriks i dopingsammenheng, er at urin er enkelt å samle inn i tilstrekkelige mengder, krever lite utstyr og det behøves ikke å ha kvalifisert helsepersonell til stede under prøvetaking.

7.2.6 Kan metoden skille mellom kreft og doping?

Ved krefttilstander kan ulike varianter av hCG produseres og frigis til blod. Disse variantene vil videre delvis degraderes slik at mange ulike varianter av hCG vil være til stede i urin. Ved misbruk av et hCG-preparat i forbindelse med doping vil varierende mengder av alle isoformer kunne detekteres i urin, uavhengig av hvilket hCG-preparat som er injisert. Det er derfor ikke mulig å skille mellom kreft og doping ved analyse av urinprøver.

Denne studien viste at ingen isoformer kan detekteres i serum etter én injeksjon av Pregnyl® eller Ovitrelle®. Ved kontinuerlig endogen hCG-produksjon i forbindelse med kreft vil både intakt hCG og hCG-isoformer kunne dannes i serum. Det er imidlertid ved svært sjeldne tilfeller at man faktisk finner hCG-isoformer i serum. Deteksjon av intakt hCG i serum kan dermed like gjerne skyldes endogent produsert hCG i forbindelse med kreft, som «kunstig» hCG tilført via injeksjon av et farmasøytisk preparat. Det er dermed ikke mulig å skille mellom kreft og doping ved analyse av serumprøver.

Denne finnes ingen metode for deteksjon av hCG i serum og urin som vil kunne skille mellom doping og kreft. Alle utøvere som tester positivt på hCG må derfor henvises til klinisk kontroll for å utelukke kreft før de kan dømmes for doping basert på hCG-deteksjon.

7.2.7 Immunoassays eller immunoaffinitets-MS i fremtidens dopingarbeid?

Det finnes i dag allerede vel etablerte metoder for deteksjon av hCG i doping. Er det behov for implementering av immunoaffinitets-MS?

Immunometriske tester basert på sandwich-prinsippet er raske og enkle. De krever lite utstyr og relativt liten grad av operatør opplæring. Problemet med immunometriske tester ligger i faren for falske positive og negative resultater, samt ulike resultater for ulike tester gjennomført på samme prøve (se avsnitt 4.5.2 «Utfordringer»).

Fordelen med immunoaffinitets-MS ligger i at det er en svært selektiv og sensitiv metode som ikke vil gi falske positive resultater da massespektrometeret kun detekterer peptidioner og tilhørende fragmenter med opphav i hCG. Ved å bruke det hCG-spesifikke antistoffet E27, som er bevist å være i stand til å gjenkjenne og isolere alle varianter av hCG, og ved å ha en tilstrekkelig følsom metode, vil det ikke generes falske negative resultater. Denne metoden vil derfor med sikkerhet kunne fastslå om en dopingprøve, urin eller serum, er positiv for hCG.

Ulempen med metoden er at den er tid- og utstyrskreven samtidig som den i større grad krever opplæring av operatør. Å benytte immunoaffinitets-MS vil derfor kanskje ikke være førstevalget når dopingprøver skal screenes for potensielle misbrukerstoffer. Men en positiv screening-analyse utført på immunoassays etterfulgt av en bekreftelsesanalyse ved immunoaffinitets-MS vil med sikkerhet kunne fastslå om utøver har benyttet hCG eller ei.

7.3 Feilkilder

Under følger en liste over potensielle feilkilder som kan ha påvirket analyseresultatene av urinprøvene. Tilsvarende problemstillinger var ikke aktuelt for serumprøver.

- Urinprøvene skal være morgenurin. Deltakere kan ha glemt å samle opp morgenurin og heller levert urin fra et senere tidspunkt. Dette vil gi konsentrasjonsvariasjoner siden prøvene ikke er kreatininjustert.
- Urinen vil være påvirket av hva og når deltaker har drukket og spist. Dette vil gi konsentrasjonsvariasjoner siden prøvene ikke er kreatininjustert.

- Urinprøvene som deltakerne selv skulle oppbevare frem til neste oppmøtedag, skulle oppbevares i kjøleskap. Ved oppbevaring i romtemperatur vil hastigheten på degraderingsprosessen øke og muligens vil lavere konsentrasjoner av intakt hCG detekteres.
- Prøveopparbeidelse av konsentrert urin viste at kulene mistet sine magnetiske egenskaper (figur 7-13). Ved utpipettering av prøveløsning og vaskeløsninger fra eppendorfrør, kan det ikke garanteres at noen kuler med potensielt bundet hCG ikke fulgte med. Dette vil gi lavere signaler når prøven analyseres på LC-MS.

En annen potensiell feilkilde er at autosampler har manglet kjøleelement under gjennomføringen av analysearbeidet. Ved kjøring av lange analyseserier over flere døgn kan prøvene med lengst henstand ha fordampet eller signaturpeptidene blitt degradert. Det er i midlertid ikke observert vesentlig forskjeller mellom første og siste deltaker i samme analyseserie eller mellom QC-prøvene. Det antas derfor at manglende kjøleelement har hatt minimal påvirkning på prøvene.

8. Konklusjon

Ved å gjennomføre en studie på 25 friske frivillige menn, har det blitt bekreftet at immunoaffinitets-MS-metoden utviklet og validert av Hanne Lund *et al.* [1-5] egner seg godt til deteksjon av injisert hCG i urin og serum. Metoden detekterer med sikkerhet hCG til og med 7 dager etter injeksjon av én dose Pregnyl[®] eller Ovitrelle[®] i serum og 10 dager i urin.

Urin er best egnet prøvematriks ved deteksjon av hCG i doping da det er mulig å detektere hCG minst 3 dager lenger i urin enn serum. I tillegg inneholder urin mindre interfererende forurensinger, det er en enkel matriks å innhente, og prøvetaking krever ikke kvalifisert helsepersonell.

Det var ikke mulig å skille mellom rhCG (Ovitrelle[®]) og uhCG(Pregnyl[®]) i serum. Urinanalyser viste derimot at det kun var urin fra deltakere i Pregnyl[®]-gruppen som var positive for den nickede varianten hCG β n47/48. Dette funnet gjør det mulig å skille mellom rhCG og uhCG ved å analysere urinprøver. Dette er i midlertidig ikke relevant i dopingsammenheng da det er tilstrekkelig å påvise bruk.

Det er ikke mulig å si om detektert hCG i en urin- eller serumprøve stammer fra injisert hCG (doping) eller endogent produsert hCG (kreftsykdom). Utøvere som tester positivt for hCG må derfor fortsatt henvises til lege for kliniske undersøkelser for å utelukke kreft før de kan dømmes for doping.

Denne immunoaffinitets-MS-metoden egner seg godt til å bekrefte deteksjon av hCG i urin i forbindelse med doping, og bør på sikt implementeres i WADAs dopingarbeid. En rask screening-analyse av hCG ved bruk av tilgjengelige immunoassay etterfulgt av immunoaffinitets-MS som bekreftelsesmetode vil med sikkerhet kunne av- eller bekrefte om utøver har misbrukt hCG.

Videre fremover skal det utføres en komparativ studie mot eksisterende metode hvor urin fra noen av deltakerne i studien skal analyseres med tilgjengelige immunoassays. Dette skal gjøres for å undersøke om immunoassays og immunoaffinitets-MS gir tilsvarende resultater.

9. Kildeliste

1. Løvsletten, K., *Bestemmelse av hCG fra biologiske prøver ved immunoekstraksjon og LC-MS/MS - Metodeoptimalisering og -validering for bruk i dopinganalyse*, Farmasøytisk Institutt, 2011, Universitetet i Oslo: Oslo.
2. Egeland, S.V., *Differensiering mellom intakt hCG og fritt hCG β i serum via betsettelse av hCG α* , Farmasøytisk Institutt, 2010, Universitetet i Oslo: Oslo.
3. Torsetnes, S.B., *Bestemmelse av hCG-isoformer i urin - Bruk av immunoaffinitet og LC-MS som analyseverktøy*, Farmasøytisk Institutt, 2009, Universitetet i Oslo: Oslo.
4. Lund, H., et al., *Exploring the complementary selectivity of immunocapture and MS detection for the differentiation between hCG isoforms in clinically relevant samples*. J Proteome Res, 2009. **8**(11): s. 5241-5252.
5. Lund, H., *Immuno-MS Based Targeted Proteomics Reality: Highly Sensitive and Reproducible hCG Detection for Clinical Diagnostics and Doping Analysis*, Manuskript under utarbeidelse, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
6. Cole, L.A., *hCG, five independent molecules*. Clinica Chimica Acta, 2012. **413**(1-2): s. 48-65.
7. Stenman, U.H., et al., *The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG*. Human Reproduction Update, 2006. **12**(6): s. 769-784.
8. Stenman, U.H., Alfthan, H., and Hotakainen, K., *Human chorionic gonadotropin in cancer*. Clinical Biochemistry, 2004. **37**(7): s. 549-561.
9. Cole, L.A., *Biological functions of hCG and hCG-related molecules*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2010. **8**.
10. Stenman, U.H., Hotakainen, K., and Alfthan, H., *Gonadotropins in doping: Pharmacological basis and detection of illicit use*. British Journal of Pharmacology, 2008. **154**(3): s. 569-583.
11. WADA - World Anti-Doping Agency. The 2012 Prohibited List - International Standard [Besøkt 9. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.wada-ama.org.
12. Cole, L.A., *19 - Quantitative hCG Assays, Human Chorionic Gonadotropin*, 2010, Elsevier: London. s. 223-228.
13. Berger, P., et al., *The ISOBM TD-7 workshop on hCG and related molecules - Towards user-oriented standardization of pregnancy and tumor diagnosis: Assignment of epitopes to the three-dimensional structure of diagnostically and commercially relevant monoclonal antibodies directed against human chorionic gonadotropin and derivatives*. Tumor Biology, 2002. **23**(1): s. 1-38.
14. Hoofnagle, A.N. and Wener, M.H., *The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry*. Journal of Immunological Methods, 2009. **347**(1-2): s. 3-11.
15. WADA - World Anti-Doping Agency. Guidelines - Reporting & Management of Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) Findings [Besøkt 9. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.wada-ama.org.
16. Gam, L.H., Tham, S.Y., and Latiff, A., *Immunoaffinity extraction and tandem mass spectrometric analysis of human chorionic gonadotropin in doping analysis*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2003. **792**(2): s. 187-196.
17. Alberts, B., et al., *Essential Cell Biology*. 2 ed, 2004, USA: Garland Science.
18. Solomons, T.W.G. and Fryhle, C.B., *Organic Chemistry*. 9 ed, 2008: John Wiley Sons, Inc.

19. Cole, L.A., *Human chorionic gonadotropin and associated molecules*. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2009. **9**(1): s. 51-73.
20. Morgan, F.J., Birken, S., and Canfield, R.E., *Amino-Acid Sequence of Human Chorionic-Gonadotropin - Alpha-Subunit and Beta-Subunit*. Journal of Biological Chemistry, 1975. **250**(13): s. 5247-5258.
21. Bahl, O.P., et al., *Human Chorionic Gonadotropin - Amino-Acid Sequence of Alpha and Beta Subunits*. Biochem Biophys Res Commun, 1972. **48**(2): s. 416-422.
22. Laphorn, A.J., et al., *Crystal structure of human chorionic gonadotropin*. Nature, 1994. **369**(6480): s. 455-461.
23. Cole, L.A., *Human chorionic gonadotropin tests*. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2009. **9**(7): s. 721-747.
24. Cole, L.A., *New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2009. **7**.
25. Norman, R.J., et al., *hCGbeta core fragment is a metabolite of hCG: evidence from infusion of recombinant hCG*. J Endocrinol, 2000. **164**(3): s. 299-305.
26. Cole, L.A., *9 - Degradation Products of hCG, Hyperglycosylated hCG, and Free β -Subunit, Human Chorionic Gonadotropin*, 2010, Elsevier: London. s. 109-118.
27. *Antidoping Norge*. Dopingens Historie [Besøkt 22. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.antidoping.no.
28. *WADA - World Anti-Doping Agency*. History [Besøkt 22. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.wada-ama.org.
29. *WADA - World Anti-Doping Agency*. World Anti-Doping Code [Besøkt 21. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.wada-ama.org.
30. *Antidoping Norge*. Dopingkontrollen [Besøkt 22. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.antidoping.no.
31. Sand, O., Sjaastad, Ø.V., and Haug, E., *Menneskets fysiologi*. 1 ed, 2001: Gyldendal Norsk Forlag.
32. *ThinkSteroids.com*. Anabolic Steroid Induced Hypogonadism (ASIH) [Besøkt 28. mars 2012]; Tilgjengelig fra: <http://thinksteroids.com>.
33. Hakansson, A., et al., *Anabolic Androgenic Steroids in the General Population: User Characteristics and Associations with Substance Use*. European Addiction Research, 2012. **18**(2): s. 83-90.
34. Pope, H.G., Kanayama, G., and Hudson, J.I., *Risk Factors for Illicit Anabolic-Androgenic Steroid Use in Male Weightlifters: A Cross-Sectional Cohort Study*. Biological Psychiatry, 2012. **71**(3): s. 254-261.
35. Kanayama, G., et al., *Risk factors for anabolic-androgenic steroid use among weightlifters: a case-control study*. Drug and Alcohol Dependence, 2003. **71**(1): s. 77-86.
36. Clement, C.L., et al., *Nonprescription Steroids on the Internet*. Substance Use & Misuse, 2012. **47**(3): s. 329-341.
37. de Souza, G.L. and Hallak, J., *Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review*. BJU Int, 2011. **108**(11): s. 1860-5.
38. *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell*, 2010: Foreningen for utgivelse av norsk legemiddelhåndbok.
39. *Statens Legemiddelverk*. Legemiddelsøk, Pregnyl [Besøkt 15. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.legemiddelverket.no.
40. *Statens Legemiddelverk*. Legemiddelsøk, Ovitrelle [Besøkt 15. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.legemiddelverket.no.
41. *Store Norske Leksikon*. Kryptorkisme [Besøkt 15. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.snl.no.

42. Hugues, J.N., *Comparative use of urinary and recombinant human chorionic gonadotropins in women*. Treat Endocrinol, 2004. **3**(6): s. 371-379.
43. Trinchard-Lugan, I., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human chorionic gonadotrophin in healthy male and female volunteers*. Reprod Biomed Online, 2002. **4**(2): s. 106-115.
44. *Store Norske Leksikon*. Urin [Besøkt 21. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.snl.no.
45. Decramer, S., et al., *Urine in Clinical Proteomics*. Molecular & Cellular Proteomics, 2008. **7**(10): s. 1850-1862.
46. Rowland, M. and Tozer, T.N., *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 4 ed, 2011: Lippincott Williams & Wilkins.
47. Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K.E., *Legemiddelanalyse*, 2004: Fagbokforlaget.
48. Cole, L.A., *20 - False Positive hCG Assays, Human Chorionic Gonadotropin*, 2010, Elsevier: London. s. 229-236.
49. Rotmensch, S. and Cole, L.A., *False diagnosis and needless therapy of presumed malignant disease in women with false-positive human chorionic gonadotropin concentrations*. Lancet, 2000. **355**(9205): s. 712-715.
50. Cole, L.A. and Khanlian, S.A., *Inappropriate management of women with persistent low hCG results*. Journal of Reproductive Medicine, 2004. **49**(6): s. 423-432.
51. Gronowski, A.M., et al., *False-Negative Results in Point-of-Care Qualitative Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Devices Due to Excess hCG beta Core Fragment*. Clinical Chemistry, 2009. **55**(7): s. 1389-1394.
52. Liebler, D.C., *Introduction to Proteomics - Tools for the New Biology*, 2002: Humana Press.
53. Ashri, N.Y. and Abdel-Rehim, M., *Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices*. Bioanalysis, 2011. **3**(17): s. 2003-2018.
54. Halquist, M.S. and Karnes, H.T., *Quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of macromolecules using signature peptides in biological fluids*. Biomedical Chromatography, 2011. **25**(1-2): s. 47-58.
55. *Pharma Suppliers & News*. SPE (Solid Phase Extraction) Training Courses For Pharmaceutical Bioanalysis [Besøkt 25. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.pharmaceutical-int.com.
56. Lim, C.K. and Lord, G., *Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002. **25**(5): s. 547-557.
57. Thevis, M., Thomas, A., and Schanzer, W., *Current role of LC-MS(/MS) in doping control*. Anal Bioanal Chem, 2011. **401**(2): s. 405-420.
58. Kicman, A.T., Parkin, M.C., and Iles, R.K., *An introduction to mass spectrometry based proteomics - Detection and characterization of gonadotropins and related molecules*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **260**: s. 212-227.
59. van den Broek, I., et al., *Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2008. **872**(1-2): s. 1-22.
60. *University of Bristol*. Mass Spectrometry Resource - Electrospray Ionisation (ESI) [Besøkt 28. mars 2012]; Tilgjengelig fra: www.chm.bris.ac.uk.
61. Kline, K.G. and Sussman, M.R., *Protein Quantitation Using Isotope-Assisted Mass Spectrometry*. Annual Review of Biophysics, Vol 39, 2010. **39**: s. 291-308.

Vedlegg

1. Godkjenning fra Regional Etisk Komité (REK)
2. Informasjonsskriv til deltakerne
3. Samtykkeerklæring
4. Informasjon om deltakere og individuelle utskillelsesprofiler



Vedlegg 1

UNIVERSITETET I OSLO

DET MEDISINSKE FAKULTET

Cand. pharm. Hanne Lund
UiO, Farmasøytisk institutt
Postboks 1068 Blindern
Internpost

**Regional komité for medisinsk og helsefaglig
forskningsetikk Sør-Øst C (REK Sør-Øst C)**

Postboks 1130 Blindern
NO-0318 Oslo

Telefon: 22 84 46 67

Dato: 09.02.2011

Deres ref.:

Vår ref.: 2010/2894 (oppgis ved henvendelse)

E-post: post@helseforskning.etikkom.no

Nettadresse: <http://helseforskning.etikkom.no>

Dopinganalyse for hCG

Vi viser til e-post av 03.01.2011 vedrørende ovennevnte prosjekt. Vedlagt e-posten var revidert informasjonsskriv og samtykkeerklæring.

Prosjektet ble behandlet på møte 20.11.09, med følgende vedtak: *Prosjektet godkjennes under forutsetning av at ovennevnte vilkår oppfylles.*

Komiteen finner at tilbakemeldingen fra prosjektleder er tilfredsstillende, og tar brevet med informasjon til orientering.

Med vennlig hilsen

Arvid Heiberg (sign.)
professor dr. med.
leder

Hege Holde Andersson
førstekonsulent

Kopi: Universitetsdirektøren, universitetsdirektørens kontor, Postboks 1072 Blindern,
Internpost

Vi ber om at alle henvendelser sendes inn via vår saksportal:

<http://helseforskning.etikkom.no> eller på e-post til: post@helseforskning.etikkom.no. Vennligst oppgi vårt saksnummer/referansenummer i korrespondansen.

Forespørsel om deltakelse i forskningsprosjektet "Påvisning av hCG i urin og serum"

Bakgrunn og hensikt

I forbindelse med gjennomføringen av antidopingprosjektet "Påvisning av hCG i urin og serum" søker Legemiddelanalyse, Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, frivillige forsøkspersoner for ett enkelt inntak av ett av to hCG preparater, Pregnyl og Ovitrelle. Til studien trenger vi friske menn i alderen 18-50 år.

For å kunne avsløre eventuelt misbruk av hCG, må vi være i stand til å gjenkjenne preparatene etter utskillelse i blod og urin med våre analysemetoder.

Hva innebærer studien?

Deltagelse innebærer en enkelt dosering av ett av to preparater. Deretter skal det i de påfølgende to uker samles inn urin- og blodprøver. I forkant av medikamentadministrering vil det måles blodtrykk av alle som skal delta i studien.

Mulige fordeler og ulemper

De fleste bivirkningene kan knyttes til den farmakologiske virkningen av langvarig bruk av hCG, nemlig økt produksjon av testosteron hvilket igjen vil kunne medføre at kroppen undertrykker sin egen produksjon av testosteron. Den medisinske vurderingen foretatt av ansvarlig lege konkluderer med at det foreligger ingen risiko for at en engangsdosering vil medføre en langvarig undertrykkelse av kroppens egen testosteronproduksjon.

Hva skjer med prøvene og informasjonen om deg?

Prøvene tatt av deg og informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Alle opplysningene og prøvene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger og prøver gjennom en navneliste. Det er kun autorisert personell knyttet til prosjektet som har adgang til navnelisten og som kan finne tilbake til deg.

Når innsamlingen av prøvene er ferdigstilt, vil prøvene oppbevares aidentifisert til år 2015 for deretter å destrueres. Analyseresultatene vil oppbevares i 10 år etter publiseringsdato (i henhold til regler for ettersyn av publiserte data), antatt år 2022.

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene når disse publiseres.

Frivillig deltakelse

Det er frivillig å delta i studien. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke til å delta i studien. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side.

Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til studien, kan du kontakte prosjektleder Hanne Lund på telefon 22855735 eller mail: hanne.lund@farmasi.uio.no.

Ytterligere informasjon om studien finnes i avsnitt "Utdypende forklaring av hva studien innebærer"

Ytterligere informasjon om biobank, personvern og forsikring finnes i avsnitt "Personvern, biobank, økonomi og forsikring"

Samtykkeerklæring følger til slutt

Utdypende forklaring av hva studien innebærer

Bakgrunnsinformasjon om studien:

Humant korionisk gonadotropin (hCG) er et hormon som naturlig produseres under graviditet. I tillegg til deteksjon av naturlig forekommende hCG (graviditet) og hCG relatert til sykdom (e. g. cancer), er deteksjon av ulovlig administrert hCG interessant i dopinganalyse. Bruk av anabole steroider forekommer i idrett, og er ulovlig. En bivirkning av tilførselen av steroider til kroppen er kroppens egen nedregulering av testosteronproduksjonen. Tilførsel av hCG vil motvirke denne effekten, og hCG er derfor på dopinglisten over ulovlige preparater som det testes for i konkurransesammenheng. Pregnyl og Ovitrelle er eksempler på farmasøytiske preparater som inneholder hCG, og som kan injiseres under og etter en steroidsyklus. Siden konsekvensene av hCG-påvisning er svært alvorlige for en idrettsutøver, og siden en eventuell påvisning må kunne bevises rettslig, er det nødvendig at metodene som benyttes for påvisning gir et korrekt bilde på hCG-nivået i idrettsutøverne som testes. Vi ønsker derfor å gjøre en studie på urin- og blodprofilen til administrert hCG i menn, basert på vår utviklede metode for hCG deteksjon ved hjelp av LC-MS metodikk. Dette for å avsløre eventuell doping i idretten.

Kriterier for deltagelse:

Til studien trenger vi friske frivillige menn i alderen 18-50 år. Forsøkspersonene kan ikke være aktive, konkurrerende idrettsutøvere (i henhold til World Anti-Doping code, artikkel 19.5).

Praktiske følger ved deltakelse:

Dette prosjektet skal utføres ved Legemiddelanalyse, Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, og ved Norges laboratorium for dopinganalyse (Oslo Universitetssykehus), Aker, som en del av antidopingforskning, under medisinsk oppsyn av overlege Egil Haug.

Blodtrykket til alle prosjektdeltakerne vil bli målt før eventuell administrasjon av medikament.

Du vil få en enkelt underhudsinjeksjon av enten Pregnyl eller Ovitrelle. Denne vil administreres ved Norges laboratorium for dopinganalyse (Oslo Universitetssykehus), Aker. Det vil tas blankprøver (blod og urin) før injeksjon av medikamentene. Blod- og urinprøver vil samles som følger i dagene og ukene etter injeksjonen:

- Morgenurin hver dag, til og med 7. dag etter injeksjon, deretter morgenurin på dag 10 og 14.
- Blodprøve på dag 1, 2, 4, 7, 10 og 14 etter injeksjon.

Urinprøver tas hjemme hos den enkelte, mens blodprøver vil videre bli tatt på Farmasøytisk Institutt, Blindern, av autorisert personale.

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi dekker dine utgifter i forbindelse med deltagelse i prosjektet.

Dersom du blir forhindret i å avgi en av de fastsatte prøvene, vennligst ta kontakt med Ann Helene Snilsberg på telefon 93854105 eller Hanne Lund på telefon 97035297.

Tidsperiode for prøveavgivning på Farmasøytisk Institutt og Oslo Universitetssykehus, Aker:

Dato:	Hendelse:
Mandag 02. mai <i>Aker</i>	Måling av blodtrykk Avgi blank serumprøve Avgi blank urinprøve Injeksjon av legemiddel
Tirsdag 03. mai <i>Farmasøytisk Institutt, Blindern</i>	Avgi blodprøve dag 1 etter injeksjon Avgi urinprøve dag 1 etter injeksjon
Onsdag 04. mai <i>Farmasøytisk Institutt, Blindern</i>	Avgi blodprøve dag 2 etter injeksjon Avgi urinprøve dag 2 etter injeksjon
Fredag 06.mai <i>Farmasøytisk Institutt, Blindern</i>	Avgi blodprøve dag 4 etter injeksjon Avgi urinprøve dag 3 og 4 etter injeksjon
Mandag 09.mai <i>Farmasøytisk Institutt, Blindern</i>	Avgi blodprøve dag 7 etter injeksjon Avgi urinprøve dag 5, 6 og 7 etter injeksjon
Torsdag 12. mai <i>Farmasøytisk Institutt, Blindern</i>	Avgi blodprøve dag 10 etter injeksjon Avgi urinprøve dag 10 etter injeksjon
Mandag 16. mai <i>Farmasøytisk Institutt, Blindern</i>	Avgi blodprøve dag 14 etter injeksjon Avgi urinprøve dag 14 etter injeksjon

Risikovurdering:

Det understrekes at det i denne studien skal injiseres en enkelt dose av hormonet hCG som er godkjent for medisinsk bruk. Tidligere vitenskapelige publikasjoner har ikke vist bivirkninger som følge av dette. Det skal derfor ikke være noen økt risiko for de komplikasjoner som i sjeldne tilfeller kan forekomme ved bruk av store doser hCG over tid. Svært sjeldne allergi- og overfølsomhetsreaksjoner kan imidlertid alltid forekomme.

Ovitrelle

Bivirkninger: Hyppige (>1/100): Endokrine: Mildt eller moderat ovarialt hyperstimuleringssyndrom. Gastrointestinale: Brekninger/kvalme, buksmerter. Øvrige: Hodepine, tretthet. Lokal reaksjon/smerter på injeksjonsstedet.

Pregnyl

Bivirkninger: Ingen hyppig rapporterte bivirkninger.

Frekvens ukjent: Immunsystemet: Generalisert utslett eller feber. Øvrige: Reaksjoner på injeksjonsstedet som blåmerker, smerte, rødme, hevelse og kløe.

Personvern, biobank, økonomi og forsikring

Personvern

Pasientopplysninger som registreres om deg er kjønn og alder. Databehandlingsansvarlig er Hanne Lund ved Farmasøytisk Institutt, UiO.

Biobank

Urin- og blodprøvene som blir tatt, og informasjonen utledet av dette materialet, vil bli lagret i en forskningsbiobank i et avlåst kontor ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt. Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultatene inngår i biobanken. Hanne Lund er ansvarshavende for biobanken. Biobanken planlegges å vare til 2015. Etter dette vil materialet bli destruert og slettet etter interne retningslinjer. Analyseresultatene vil oppbevares i 10 år etter publiseringsdato (i henhold til regler for ettersyn av publiserte data), antatt år 2022.

Rett til innsyn og sletting av opplysninger om deg og sletting av prøver

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

Økonomi

Studien og biobanken er finansiert gjennom forskningsmidler fra UiO (departement) og World Anti-Doping Agency. Biobankmaterialet skal brukes til antidopingforskning og det er ingen kommersielle interesser knyttet til prosjektet eller materialet som inngår i det. Det er ingen bindinger mellom prosjektleder og sponsor som kan indikere noen interessekonflikter.

Honorar

Alle som deltar i studien vil få et honorar på NOK 1000,- per person som kompensasjon for tapt arbeidstid og transport. Dette utbetales rett etter avsluttet prøveavgiving.

Forsikring

Peter Hemmersbach, Seksjonssjef ved Norges laboratorium for dopinganalyse, Hormonlaboratoriet, har tegnet forsikring i Legemiddelansvarsforeningen, og alle som deltar i dette prosjektet er forsikret i henhold til denne.

Informasjon om utfallet av studien

Når resultatene av prosjektet foreligger har alle som har deltatt rett til informasjon om resultatet, og når resultatene er publisert kan de som ønsker det få en kopi av artikkelen.

Kontaktpersoner

Prosjektleder og kontaktperson

Hanne Lund

Stipendiat

Telefon: 22855735

Mobil: 97035297

E-post: hanne.lund@farmasi.uio.no

Kontaktperson i perioden for prøveavgiving

Ann Helene Snilsberg

Masterstudent

Mobil: 93854105

E-post: annhsn@student.farmasi.uio.no

Prosjektansvarlig

Peter Hemmersbach, Prof. Dr.

Seksjonssjef ved Norges laboratorium for dopinganalyse, Hormonlaboratoriet

Telefon: 22894368

E-post: peter.hemmersbach@farmasi.uio.no

Vedlegg 3

Samtykke til deltakelse i studien

Jeg er villig til å delta i studien

(Signert av prosjektdeltaker, dato)

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

(Signert, rolle i studien, dato)

Vedlegg 4

Dette vedlegget inneholder informasjon om deltakerne, individuelle utskillelsesprofiler for hCG α , hCG β og isoformer i urin, samt utskillelsesprofiler for hCG i serum og urin.

Deltakerinformasjon:

Boksen viser essensiell deltakerinformasjon som alder og hvilket hCG-preparat deltaker fikk, samt hvilke standardkurver som ble benyttet for kvantifisering av hCG i urin og serum med respektive r^2 -verdi. I tillegg er det lagt inn en mulighet for bemerkninger som kan forklare resultater, avvik i regresjonslinjer, avvik i prøvetaking etc.

Utskillelsesprofiler for hCG α og hCG β i urin:

Denne grafen inneholder utskillelsesprofiler for hCG α og hCG β . Benevnningen på y-aksen er satt til signaturpeptid/IS. Dette henspeiler på at signalresponsen for det aktuelle signaturpeptidet er korrigert for variasjoner i analyseinstrumentet ved å dele på signalresponsen for intern standarden.

Utskillelsesprofil for isoformer i urin:

Grafen viser deteksjon av de ulike degraderingsproduktene hCG β n47/48, hCG β n44/45 og hCG β cf, i urin. Benevnningen på y-aksen er satt til signaturpeptid/IS. Dette henspeiler på at signalresponsen for det aktuelle signaturpeptidet er korrigert for variasjoner i analyseinstrumentet ved å dele på signalresponsen for intern standarden.

Utskillelsesprofil for hCG:

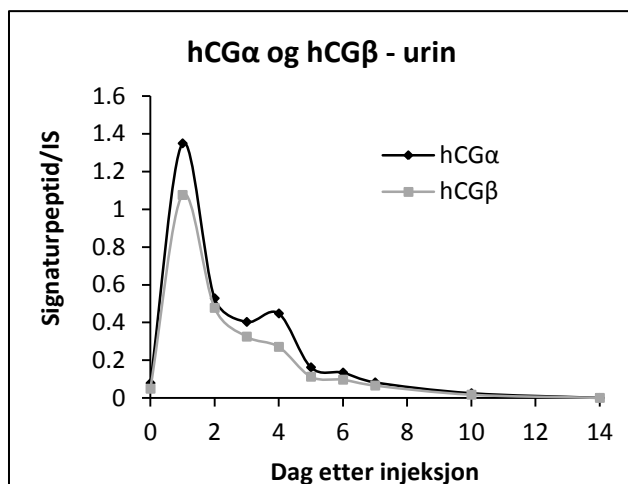
Grafen viser utskillelsesprofil for kvantifisert hCG i urin og serum. Grafen er et uttrykk for verdiene i tabellen ved siden av. Konsentrasjonen er målt i IE/L.

Tabell:

Tabellen inneholder kalkulert konsentrasjon av hCG i serum og urin. Beregningen er gjort ved å benytte regresjonslinjen som fremkom av standardkurve for gitt analysedag. Følgende forkortelser er benyttet i tabell:

- **ID:** hCG ikke detektert
- **x:** Prøvedag ikke inkludert i studien for serum, kun for urin.
- **-:** Deltaker har ikke avgitt prøve for aktuell dag.

Deltaker 1



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl®

Alder: 21

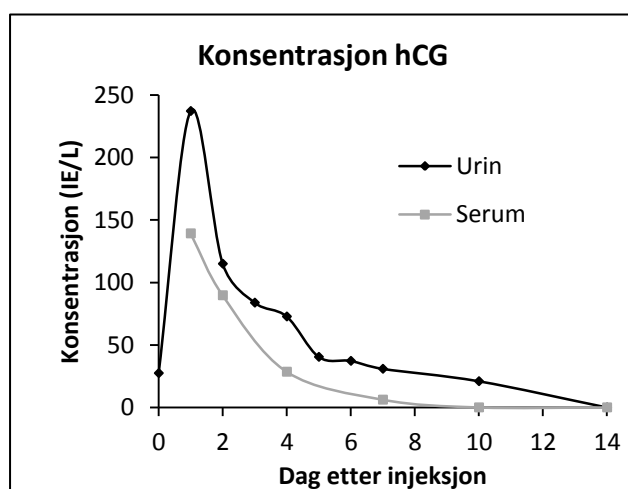
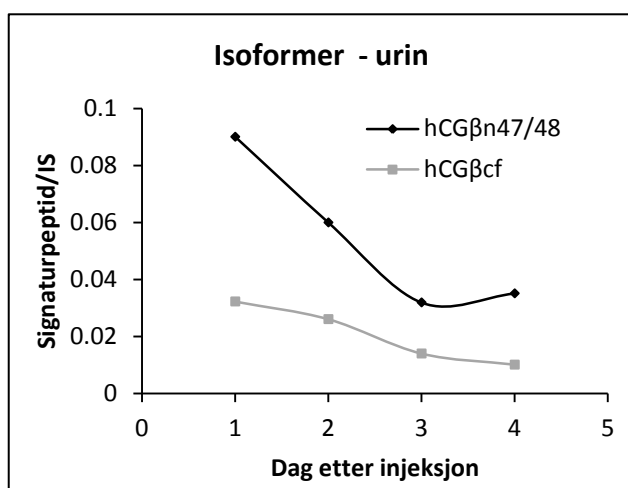
Bemerkninger:

- hCG β detektert i urin-nullprøve. Ikke detektert på dag 14 eller i serum ved dag 1 eller 14. Skyldes kontaminering fra operatør.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0049x - 0,0858$, $r^2 = 0,988$

Serum: $y = 0,0055x + 0,0271$, $r^2 > 0,999$

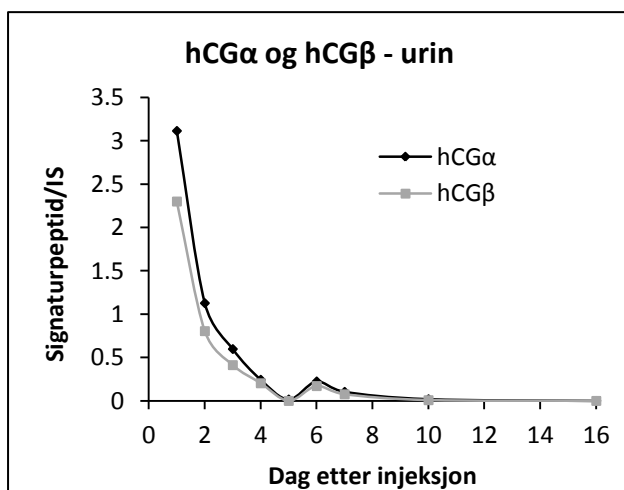


Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	27	ID
1	237	139
2	115	90
3	84	x
4	73	29
5	40	x
6	37	x
7	31	6
10	21	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign.

Deltaker 2



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl®

Alder: 19

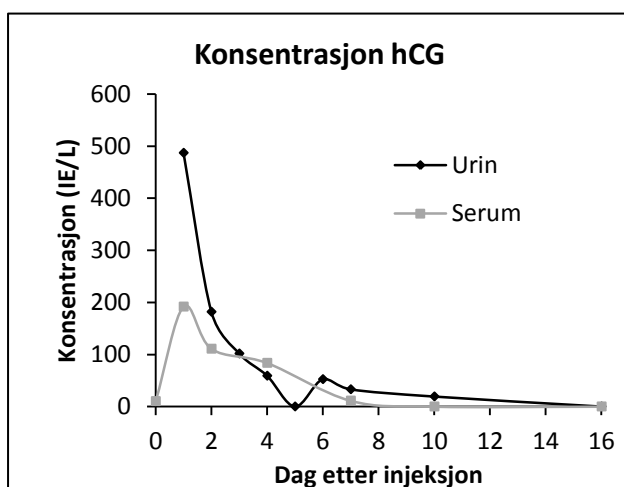
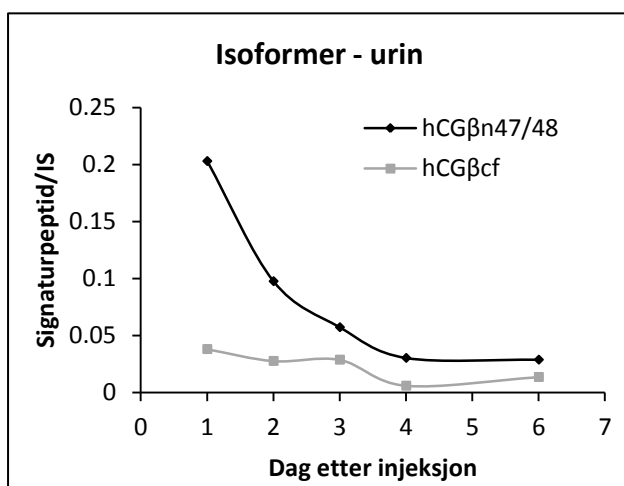
Bemerkninger:

- Urin- og serumprøver for dag 14 ble avgitt dag 16
- hCG β detektert i serum-nullprøve. Ikke detektert på dag 16 eller dag 1 eller 16 i urin. Skyldes kontaminering fra operatør.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0049x - 0,0858$, $r^2 = 0,988$

Serum: $y = 0,0055x + 0,0271$, $r^2 > 0,999$



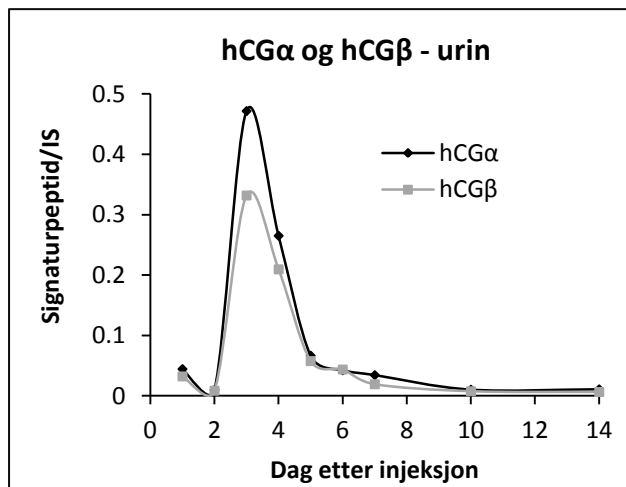
Konsentrasjon hCG (IE/L)

Dag	Urin	Serum
0	ID	10
1	487	192
2	182	111
3	102	x
4	59	84
5	ID	x
6	52	x
7	33	11
10	19	ID
16	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 3



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 23

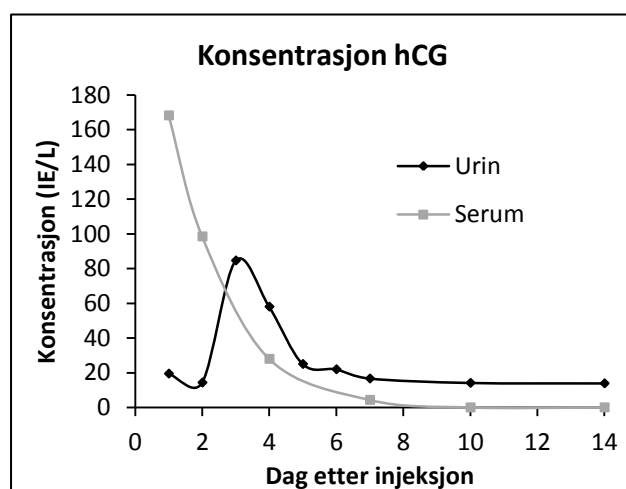
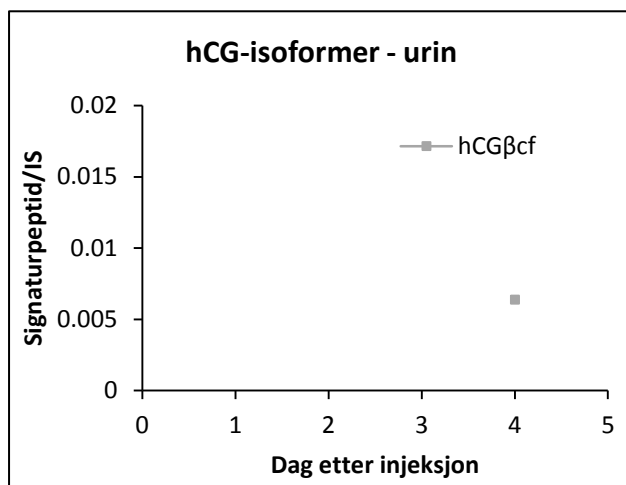
Bemerkninger:

- Ingen

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0046x - 0,0573$, $r^2 > 0,999$

Serum: $y = 0,0055x + 0,0271$, $r^2 > 0,999$

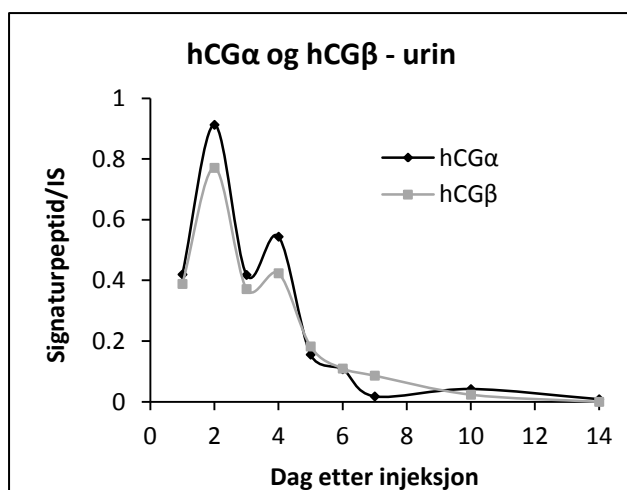


Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	19	168
2	14	98
3	85	x
4	58	28
5	25	x
6	22	x
7	17	4
10	14	ID
14	14	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 4



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 35

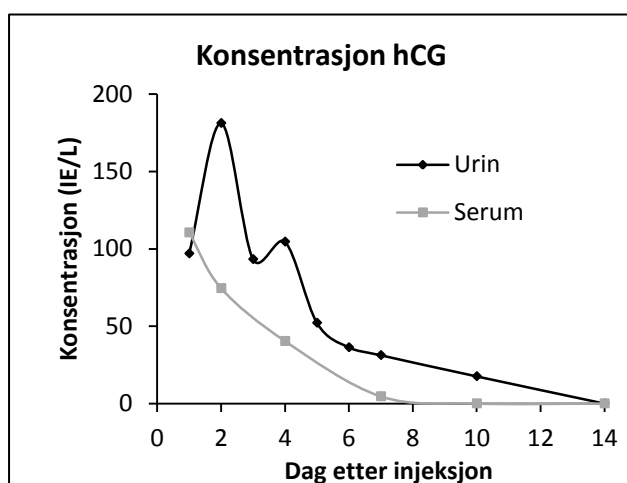
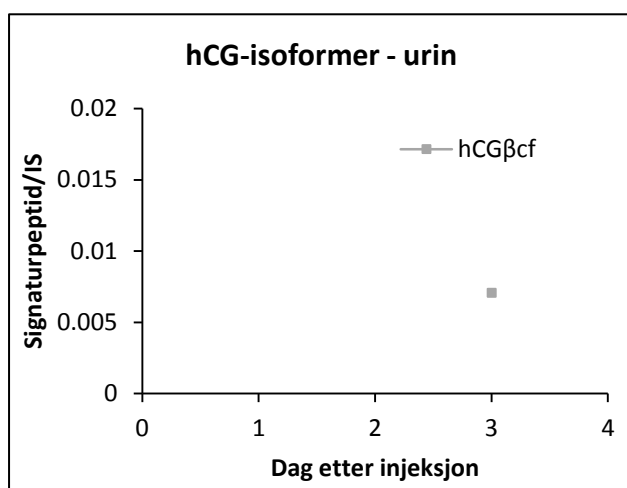
Bemerkninger:

- Ingen

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0046x - 0,0573$, $r^2 > 0,999$

Serum: $y = 0,0055x + 0,0271$, $r^2 > 0,999$



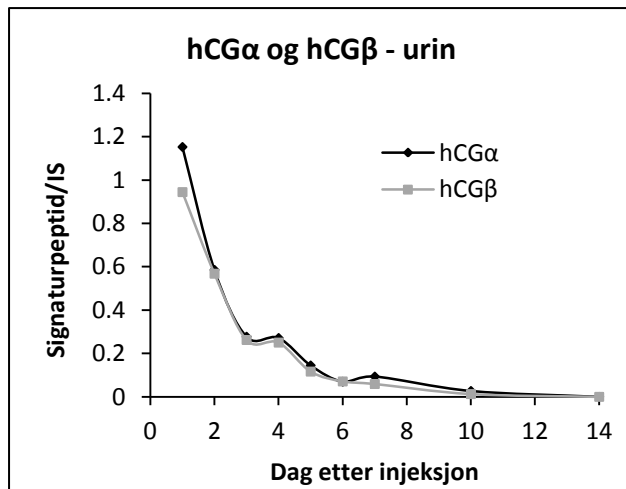
Konsentrasjon hCG (IE/L)

Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	97	111
2	181	75
3	93	x
4	105	40
5	52	x
6	36	x
7	31	5
10	18	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 5



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl®

Alder: 25

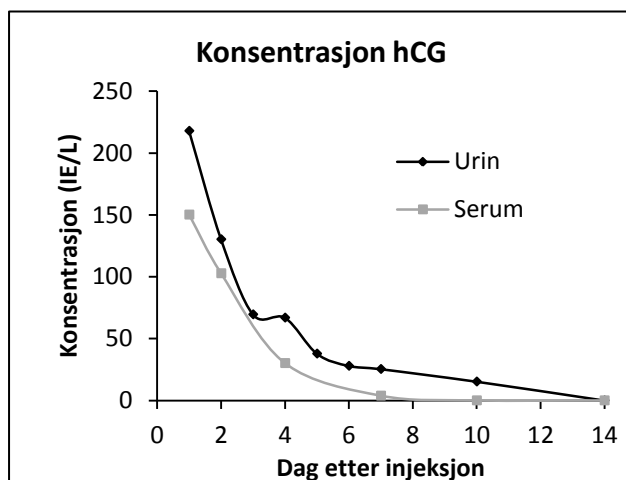
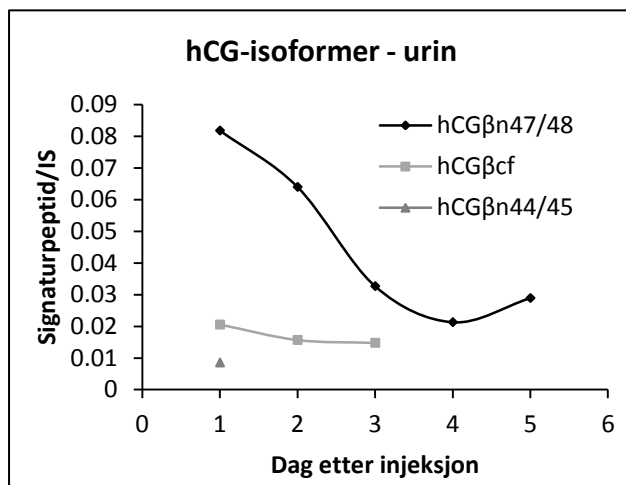
Bemerkninger:

- Ingen

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0046x - 0,0573$, $r^2 > 0,999$

Serum: $y = 0,0055x + 0,0271$, $r^2 > 0,999$

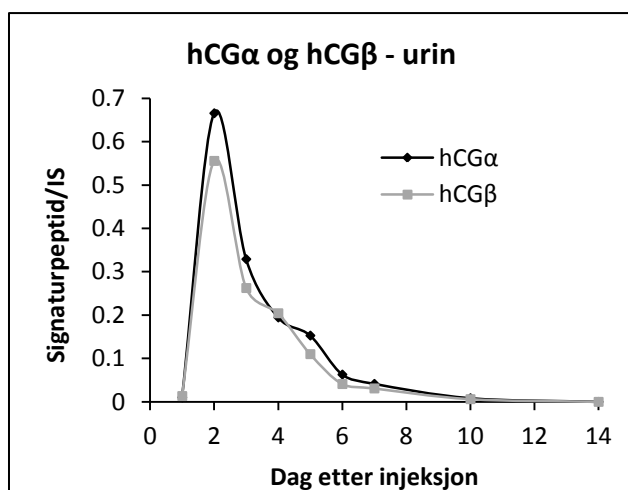


Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	218	150
2	130	103
3	70	x
4	67	30
5	38	x
6	28	x
7	25	4
10	15	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 6



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl®

Alder: 22

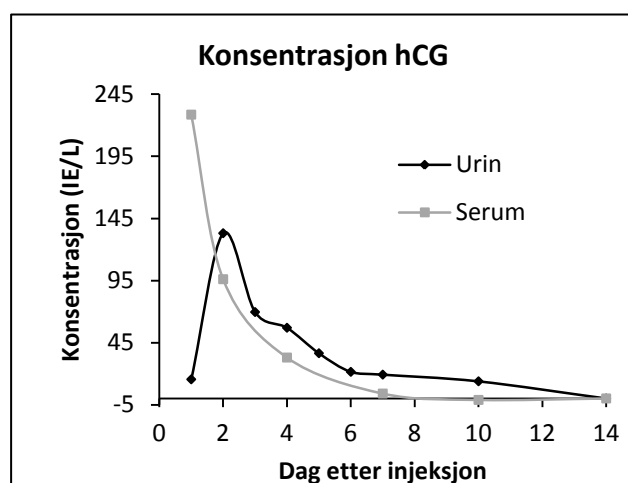
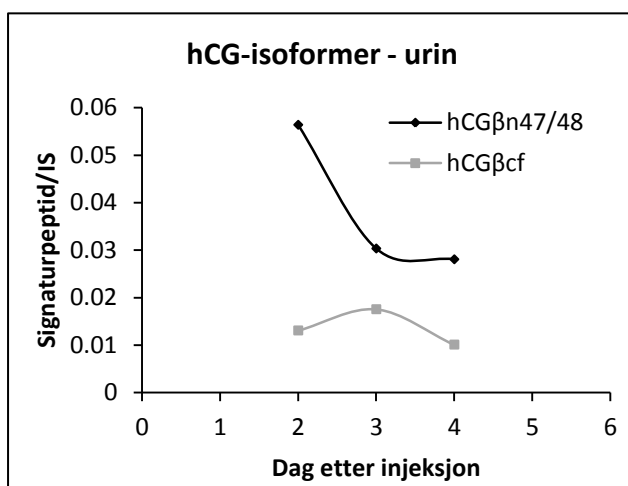
Bemerkninger:

- Negativ hCG-konsentrasjon i serum dag 10 skyldes at standardkurven ikke går gjennom origo.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0046x - 0,0573$, $r^2 > 0,999$

Serum: $y = 0,0055x + 0,0271$, $r^2 > 0,999$

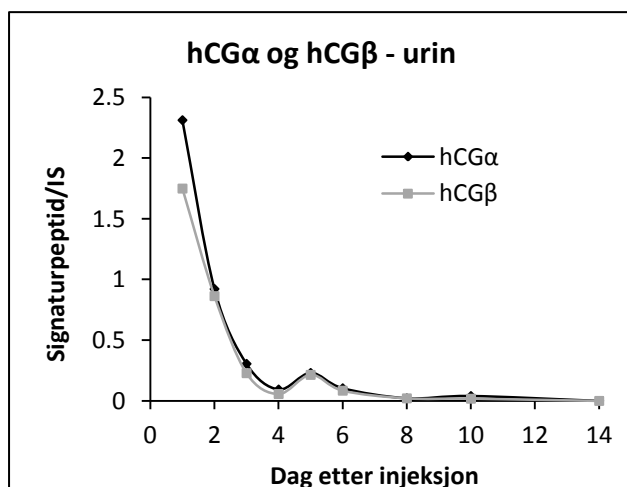


Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	15	228
2	133	96
3	70	x
4	57	33
5	36	x
6	21	x
7	19	4
10	14	-1
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 7



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 21

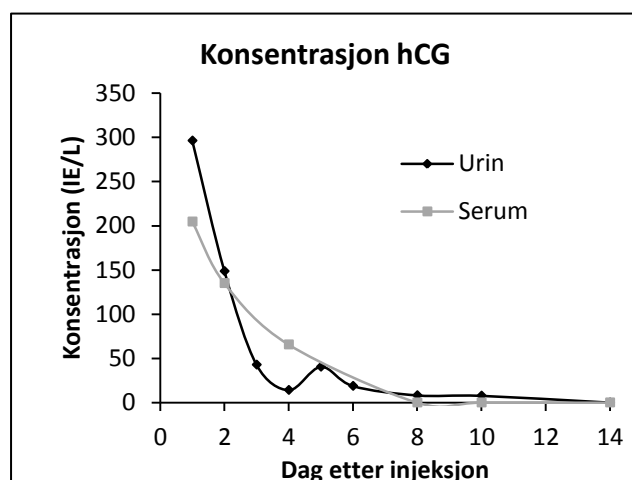
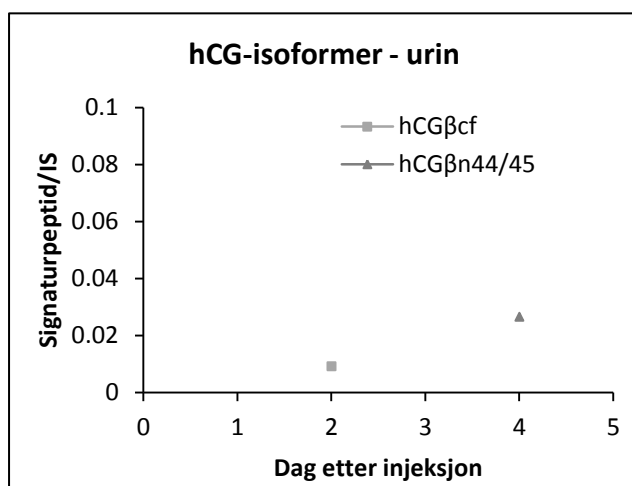
Bemerkninger:

- Urin- og serumprøver for dag 7 ble avgitt på dag 8.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,006x - 0,0279$, $r^2 > 0,999$

Serum: $y = 0,0059x - 0,1587$, $r^2 = 0,980$

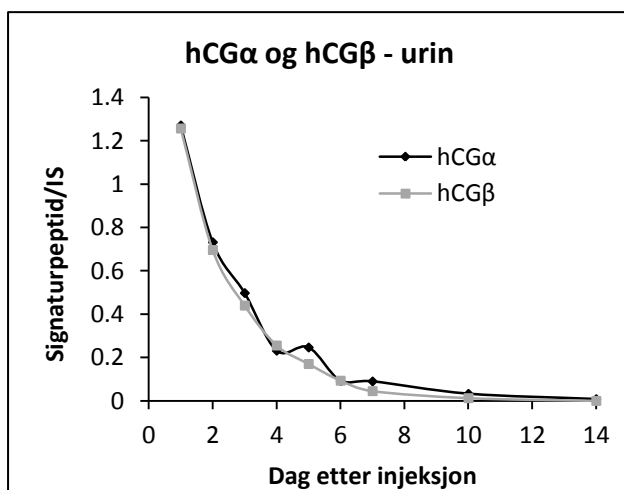


Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	296	205
2	149	135
3	43	x
4	14	66
5	40	x
6	19	x
8	8	ID
10	8	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 8



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl®

Alder: 28

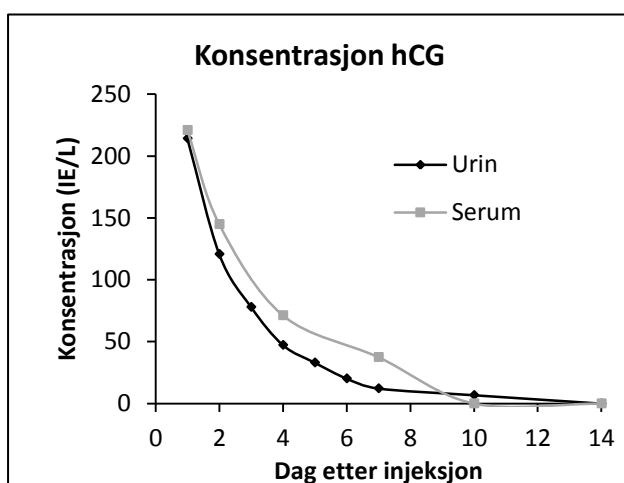
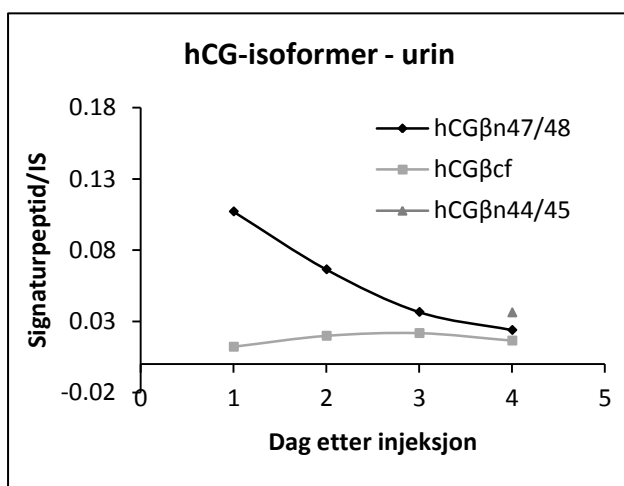
Bemerkninger:

- Ingen

Standardkurver:

Urin: $y = 0,006x - 0,0279$, $r^2 > 0,999$

Serum: $y = 0,0059x - 0,1587$, $r^2 = 0,980$



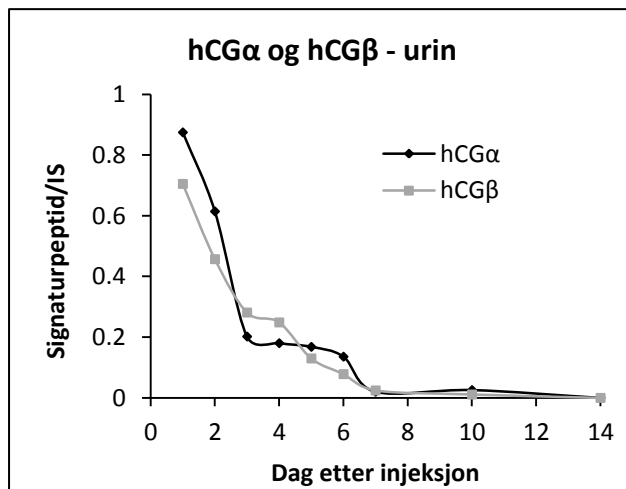
Konsentrasjon hCG (IE/L)

Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	214	221
2	121	145
3	78	x
4	47	71
5	33	x
6	20	x
7	12	37
10	7	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 9



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl®

Alder: 26

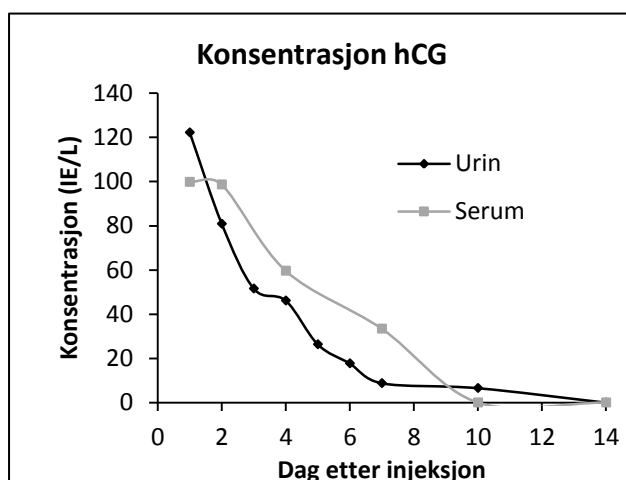
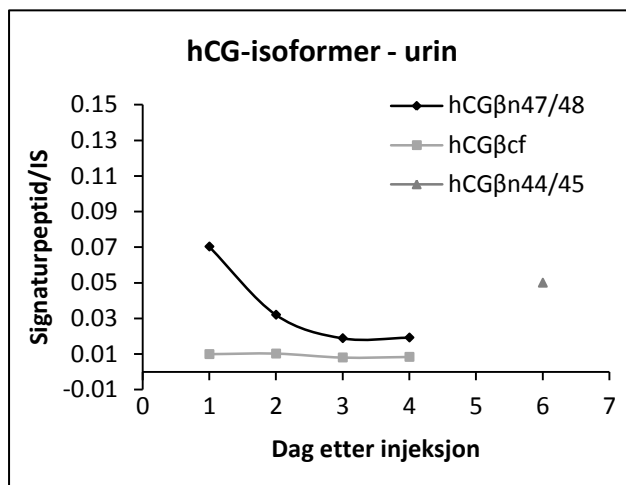
Bemerkninger:

- Ingen

Standardkurver:

Urin: $y = 0,006x - 0,0279$, $r^2 > 0,999$

Serum: $y = 0,0059x - 0,1587$, $r^2 = 0,980$



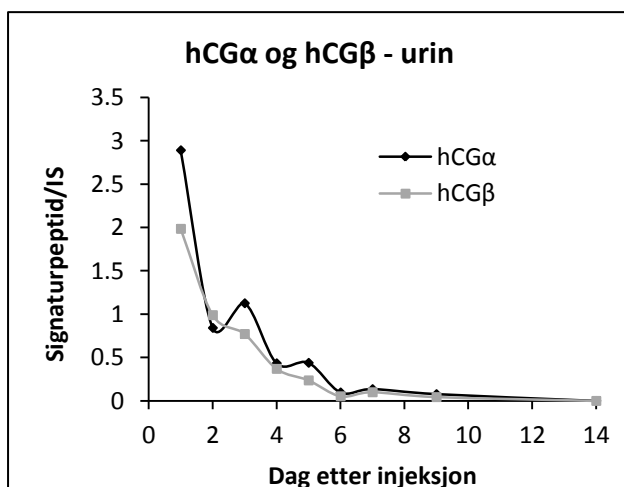
Konsentrasjon hCG (IE/L)

Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	122	100
2	81	99
3	52	x
4	46	60
5	26	x
6	18	x
7	9	33
10	7	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 10



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl[®]

Alder: 25

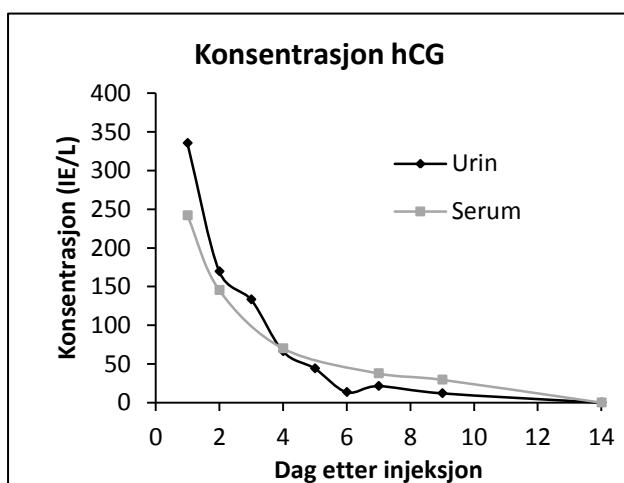
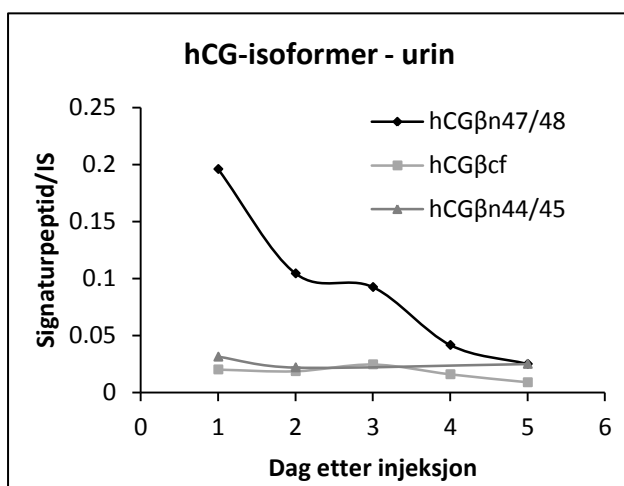
Bemerkninger:

- Urin- og serumprøver for dag 10 ble avgitt dag 9.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,006x - 0,0279$, $r^2 > 0,999$

Serum: $y = 0,0059x - 0,1587$, $r^2 = 0,980$



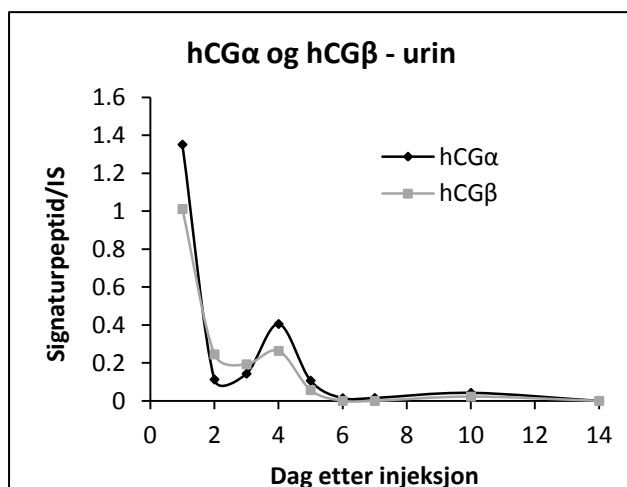
Konsentrasjon hCG (IE/L)

Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	336	242
2	170	145
3	133	x
4	66	70
5	44	x
6	14	x
7	21	38
9	12	30
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 11



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 29

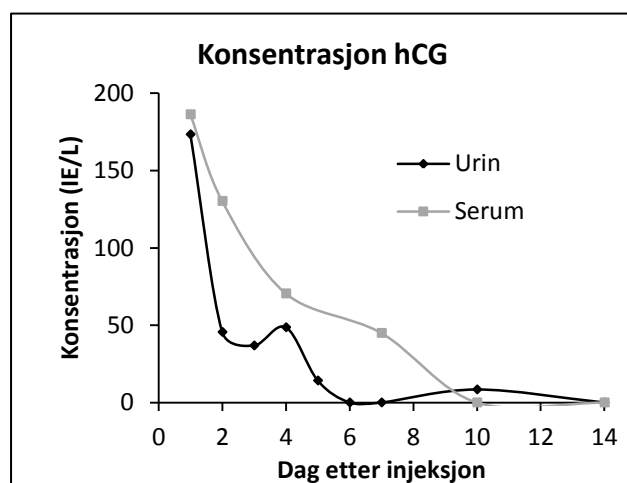
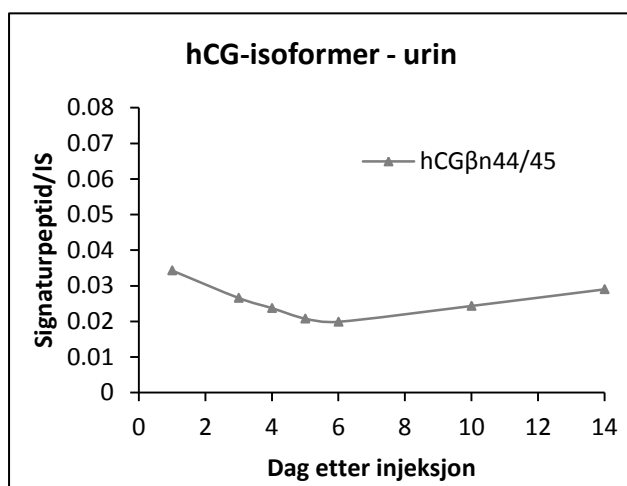
Bemerkninger:

- Ingen

Standardkurver:

Urin: $y = 0,006x - 0,0279$, $r^2 > 0,999$

Serum: $y = 0,0059x - 0,1587$, $r^2 = 0,980$

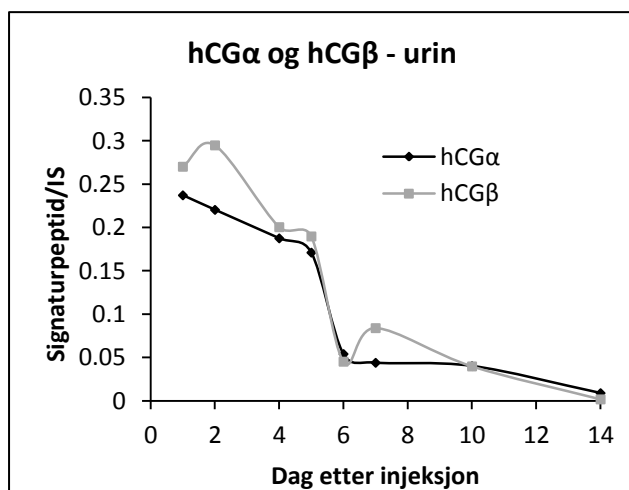


Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	173	186
2	46	130
3	37	x
4	49	70
5	14	x
6	ID	x
7	ID	45
10	8	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 12



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 26

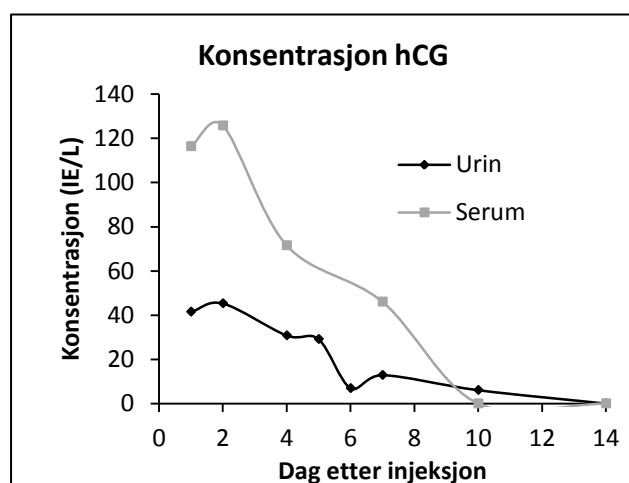
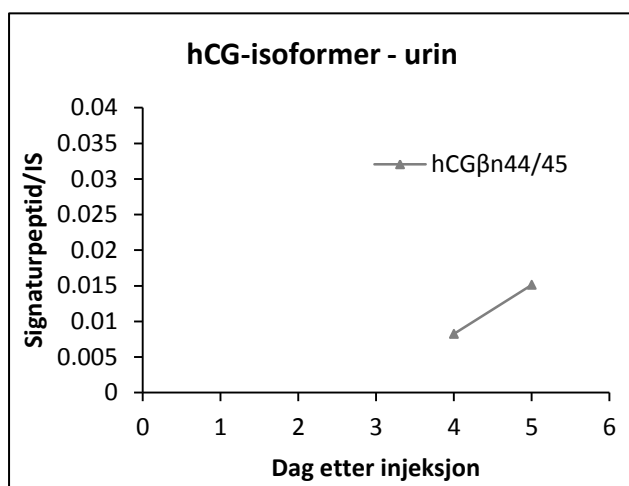
Bemerkninger:

- Ikke avgitt urinprøve for dag 3.
- Standardkurve-urin: kurven ble laget for konsentrasjonene 1, 5, 10, 50, 75 IE/L pga. feil fortynning. Benytter ekstrapolering for denne regresjonslinjen til kvantifisering av hCG.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0065x + 0,0003$, $r^2 = 0,997$

Serum: $y = 0,0059x - 0,1587$, $r^2 = 0,980$



Konsentrasjon hCG (IE/L)

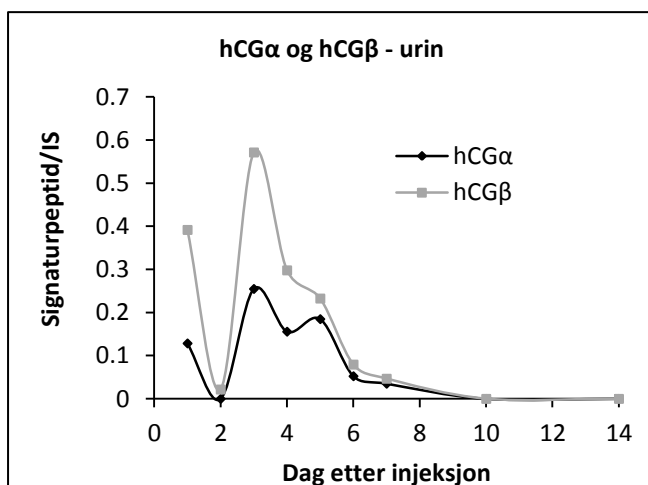
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	42	116
2	45	126
3	-	x
4	31	72
5	29	x
6	7	x
7	13	46
10	6	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

- = Ikke avgitt prøve

Deltaker 13



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl®

Alder: 26

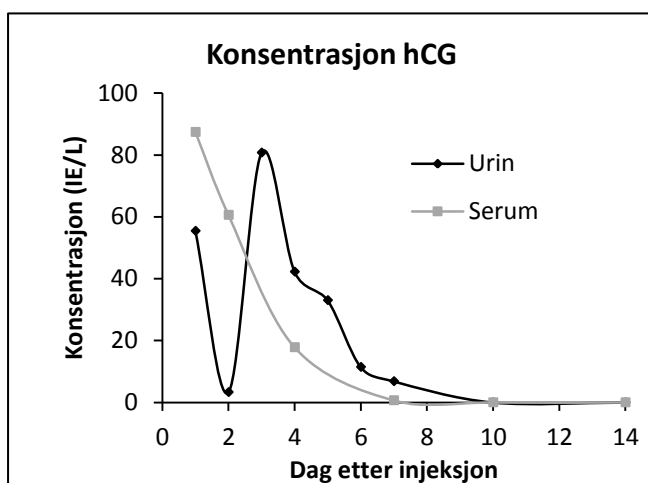
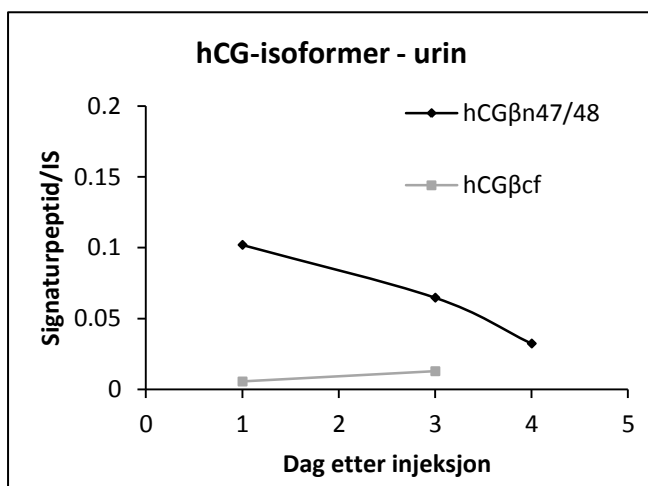
Bemerkninger:

- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0071x - 0,0017$, $r^2 = 0,998$

Serum: $y = 0,0058x + 0,0296$, $r^2 > 0,999$



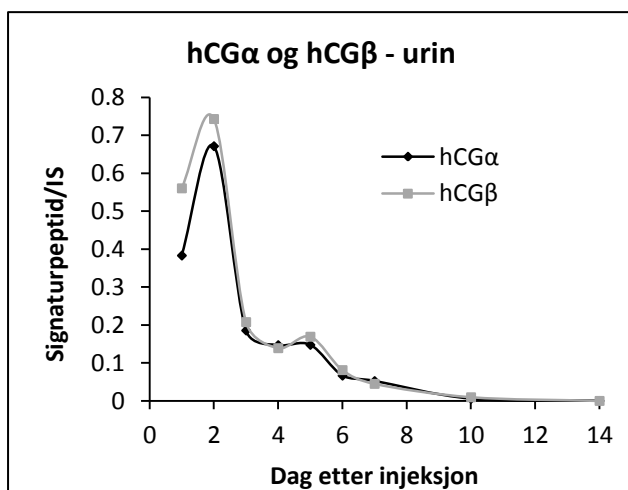
Konsentrasjon hCG (IE/L)

Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	55	87
2	3	61
3	81	x
4	42	18
5	33	x
6	11	x
7	7	1
10	ID	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 14



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 43

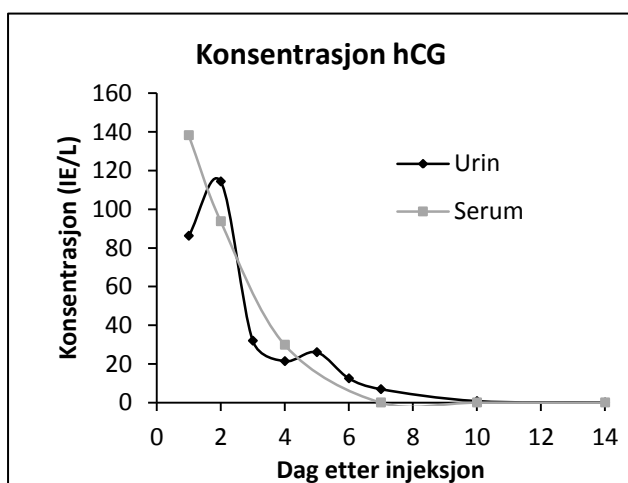
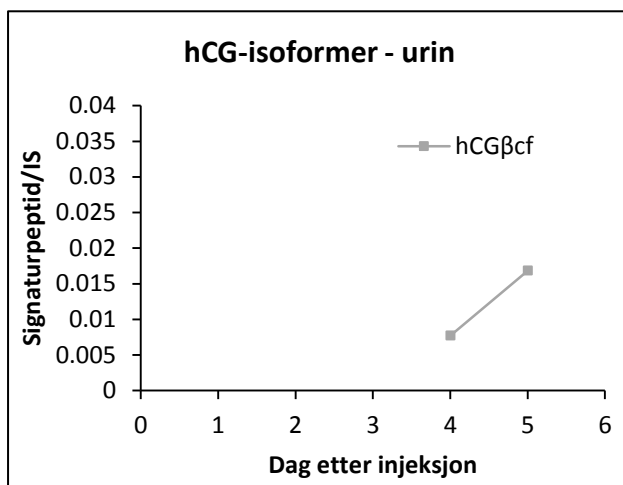
Bemerkninger:

- Standardkurve-urin: kurven ble laget for konsentrasjonene 1, 5, 10, 50, 75 IE/L pga. feil fortynning. Benytter ekstrapolering for denne regresjonslinjen til kvantifisering av hCG.
- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0065x + 0,0003$, $r^2 = 0,997$

Serum: $y = 0,0058x + 0,0296$, $r^2 > 0,999$

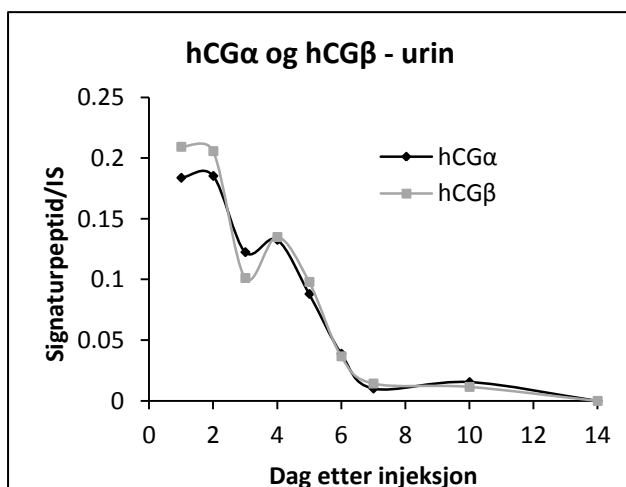


Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	86	138
2	114	94
3	32	x
4	21	30
5	26	x
6	12	x
7	7	ID
10	1	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 15



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl®

Alder: 32

Bemerkninger:

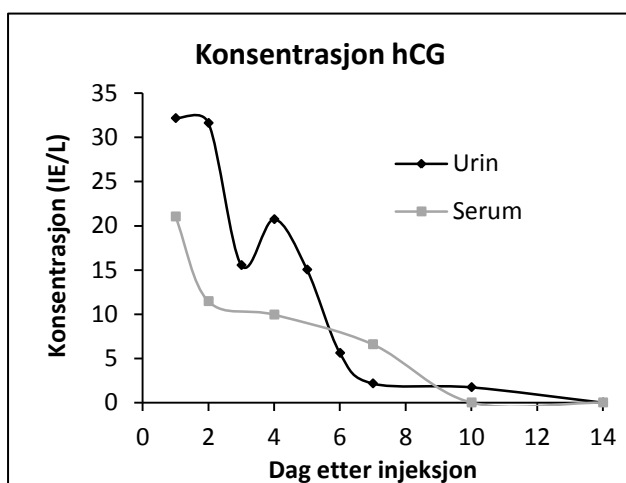
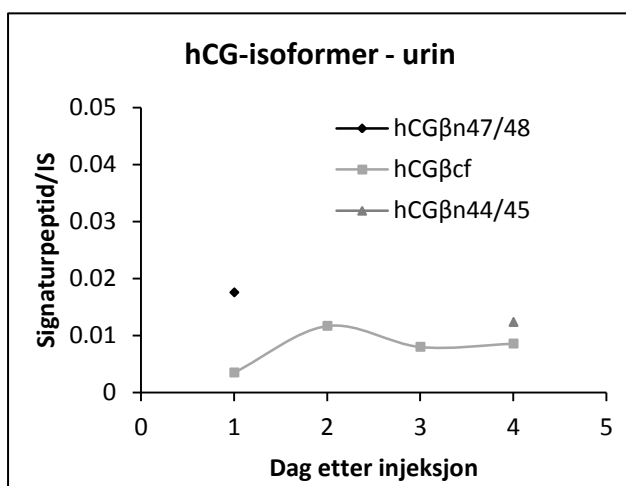
- Standardkurve-urin: kurven ble laget for konsentrasjonene 1, 5, 10, 50, 75 IE/L pga. feil fortynning. Benytter ekstrapolering for denne regresjonslinjen til kvantifisering av hCG.

- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0065x + 0,0003$, $r^2 = 0,997$

Serum: $y = 0,0058x + 0,0296$, $r^2 > 0,999$

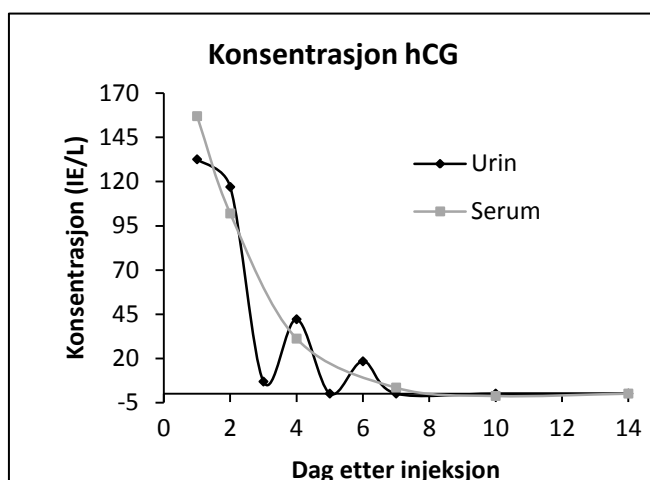
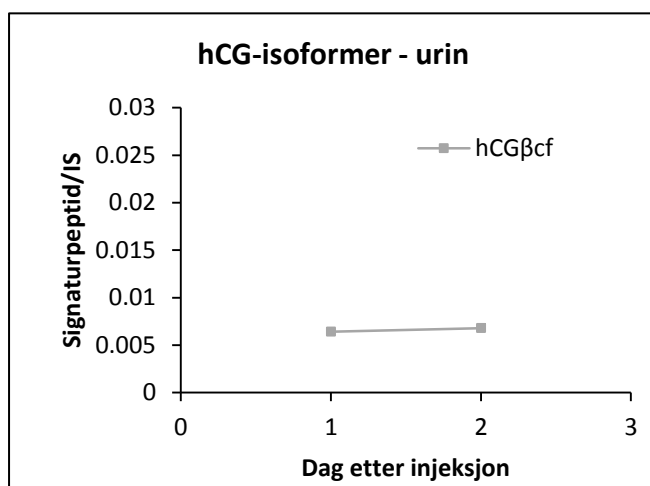
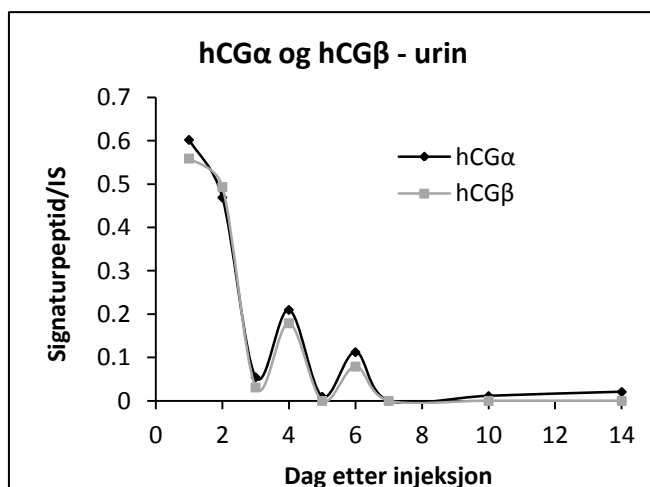


Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	32	21
2	32	11
3	16	x
4	21	10
5	15	x
6	6	x
7	2	7
10	2	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 16



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 25

Bemerkninger:

- Standardkurve-urin: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Negativ hCG-konsentrasjon i serum dag 10 skyldes at standardkurven ikke går gjennom origo.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0042x + 0,0026$, $r^2 > 0,999$

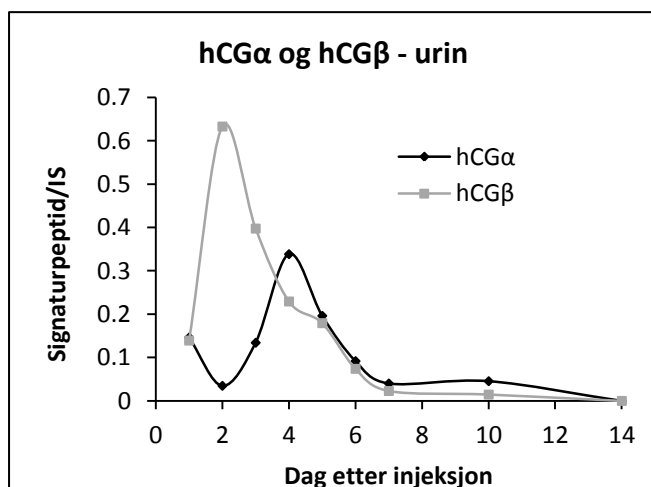
Serum: $y = 0,0058x + 0,0296$, $r^2 > 0,999$

Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	133	157
2	117	102
3	7	x
4	42	31
5	ID	x
6	18	x
7	ID	3
10	ID	-1
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 17



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl®

Alder: 23

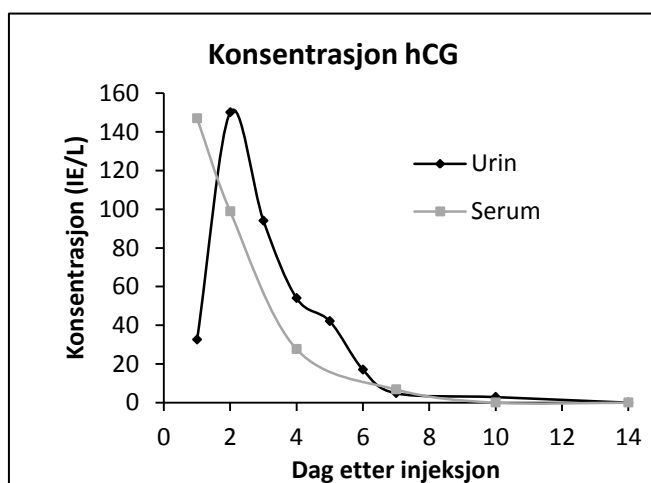
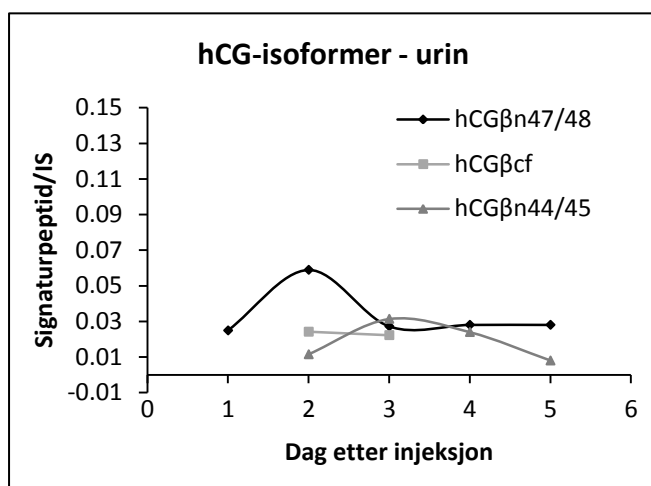
Bemerkninger:

- Standardkurve-urin: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0042x + 0,0026$, $r^2 > 0,999$

Serum: $y = 0,0058x + 0,0296$, $r^2 > 0,999$

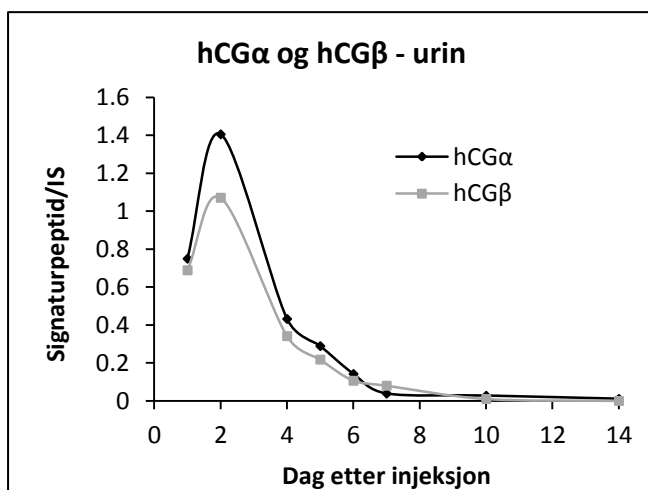


Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	33	147
2	150	99
3	94	x
4	54	28
5	42	x
6	17	x
7	5	7
10	3	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 18



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl®

Alder: 27

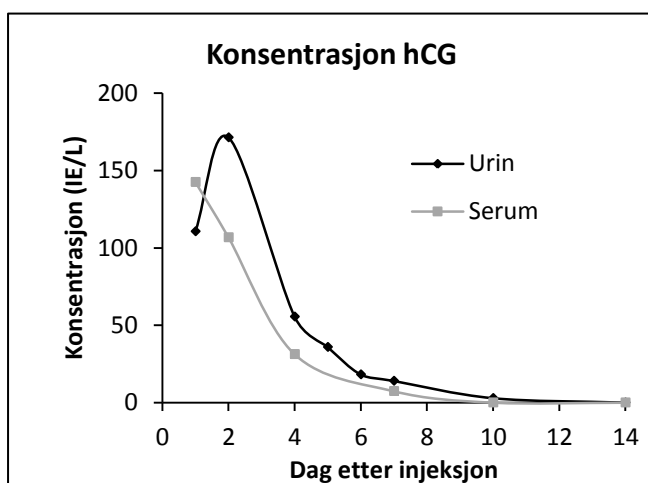
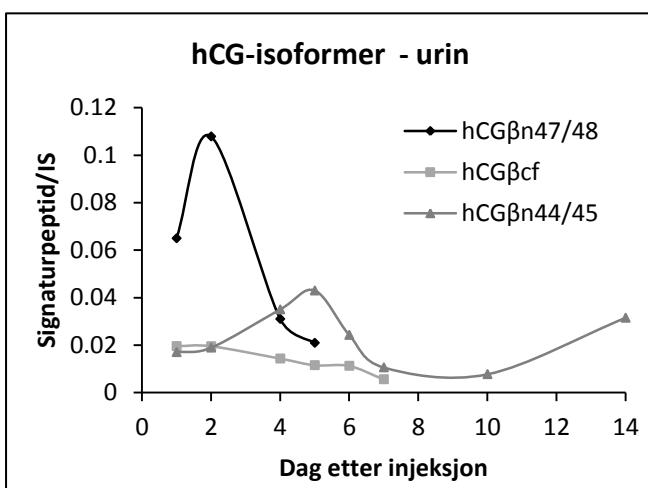
Bemerkninger:

- Ikke avgitt urinprøve for dag 3.
- Standardkurve-urin: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0063x - 0,0082$, $r^2 > 0,999$

Serum: $y = 0,0058x + 0,0296$, $r^2 > 0,999$



Konsentrasjon hCG (IE/L)

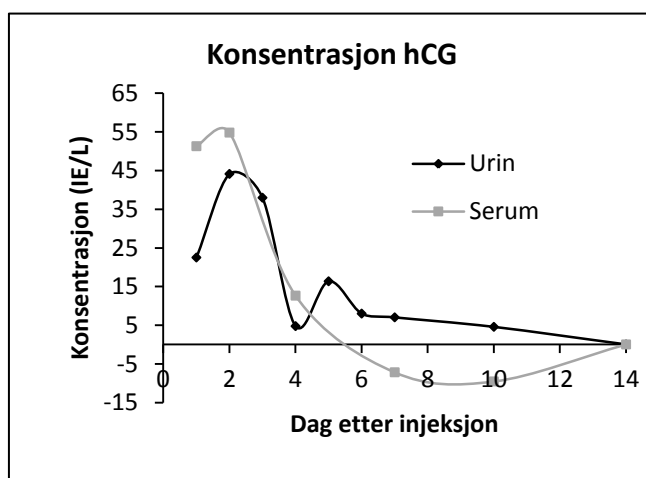
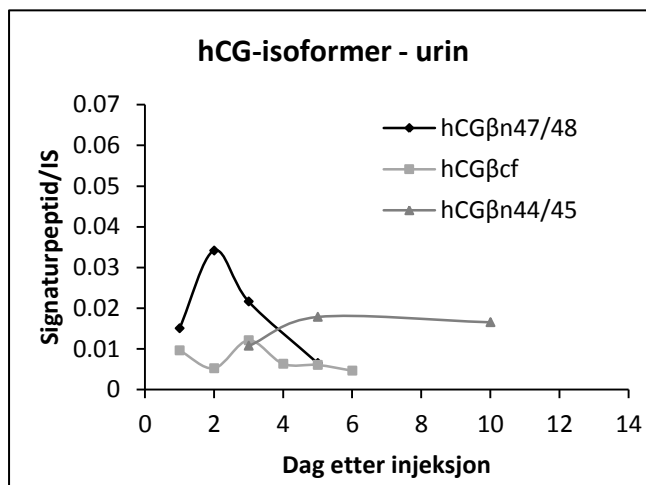
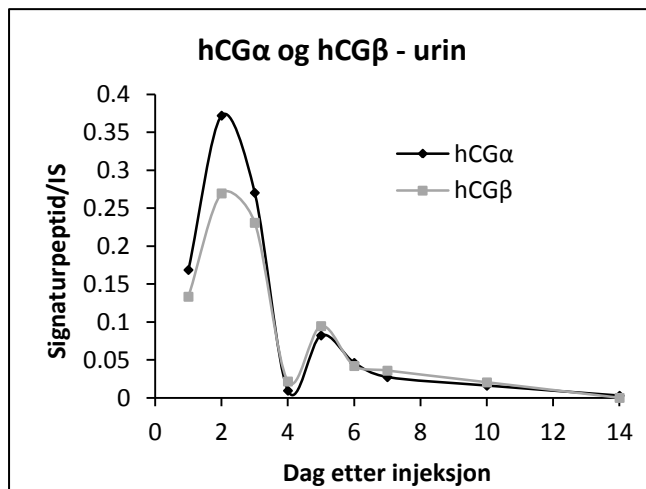
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	111	143
2	171	107
3	-	x
4	56	31
5	36	x
6	18	x
7	14	7
10	3	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

- = Ikke avgitt prøve

Deltaker 19



Deltakerinfo:

Preparat: Pregnyl®

Alder: 23

Bemerkninger:

- Standardkurve-urin: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Negativ hCG-konsentrasjon i serum dag 7 og 10 skyldes at standardkurven ikke går gjennom origo.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0063x - 0,0082$, $r^2 > 0,999$

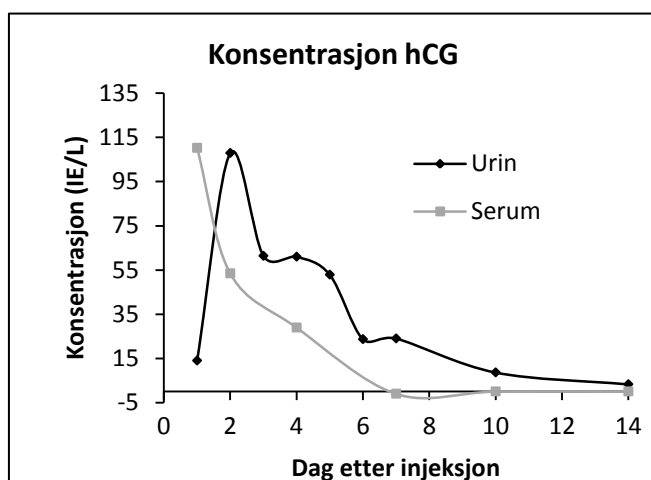
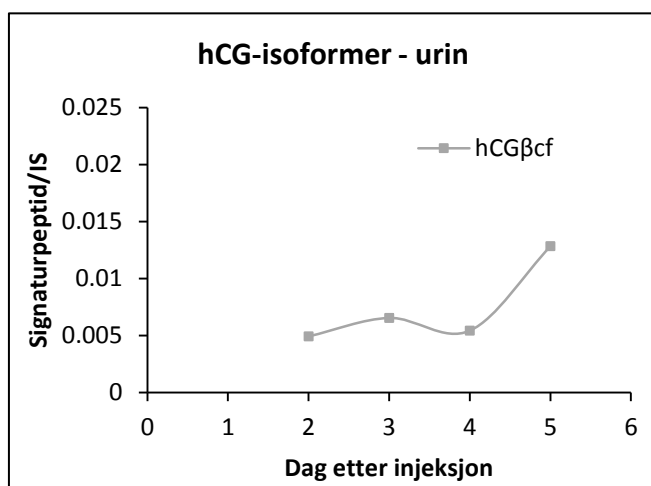
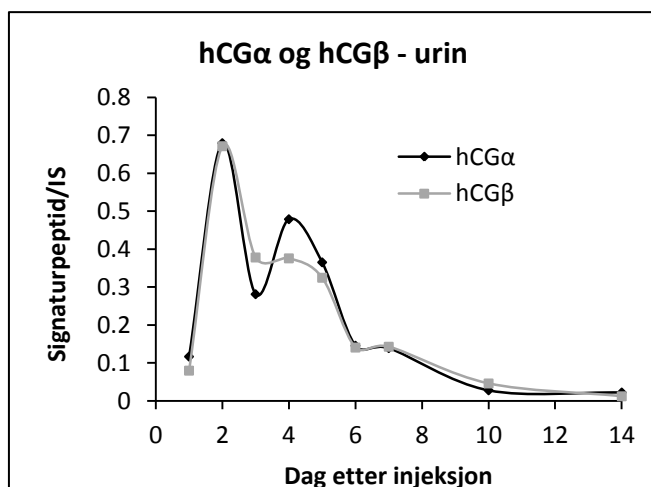
Serum: $y = 0,0065x + 0,0875$, $r^2 > 0,999$

Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	22	51
2	44	55
3	38	x
4	5	13
5	16	x
6	8	x
7	7	-7
10	5	-10
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 20



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 39

Bemerkninger:

- Standardkurve-urin: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Negativ hCG-konsentrasjon i serum dag 7 skyldes at standardkurven ikke går gjennom origo.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0063x - 0,0082$, $r^2 > 0,999$

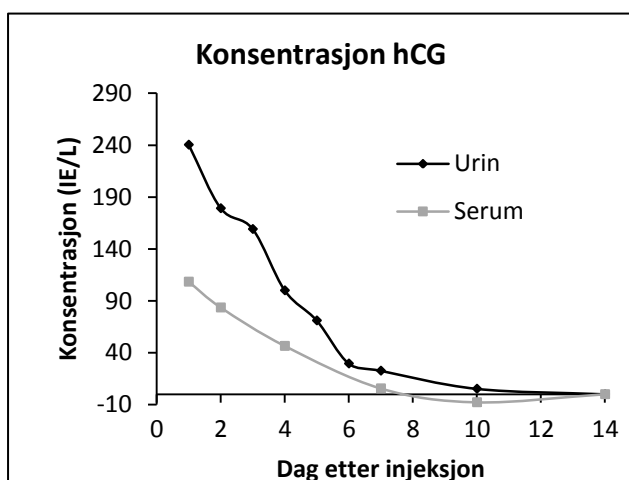
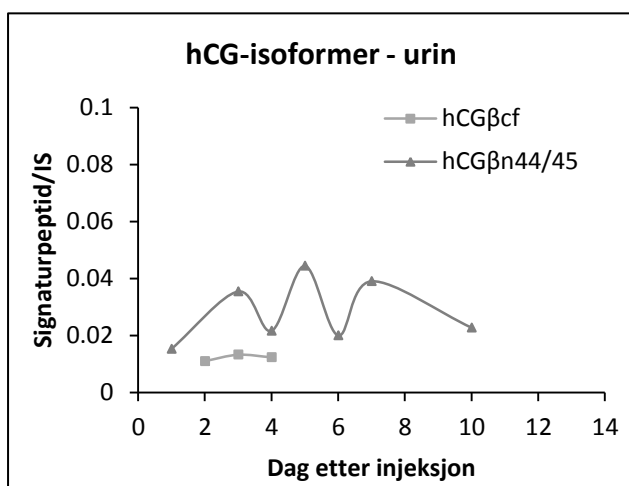
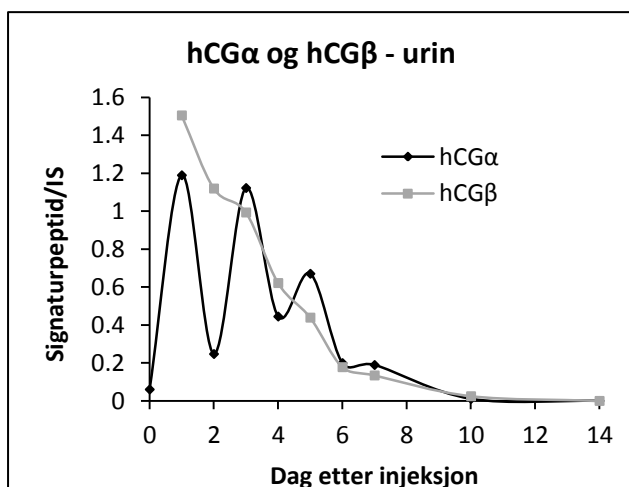
Serum: $y = 0,0065x + 0,0875$, $r^2 > 0,999$

Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	14	110
2	108	53
3	61	x
4	61	29
5	53	x
6	24	x
7	24	-1
10	9	ID
14	3	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 22



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 39

Bemerkninger:

- Standardkurve-urin: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Negativ hCG-konsentrasjon i serum dag 10 skyldes at standardkurven ikke går gjennom origo.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0063x - 0,0082$, $r^2 > 0,999$

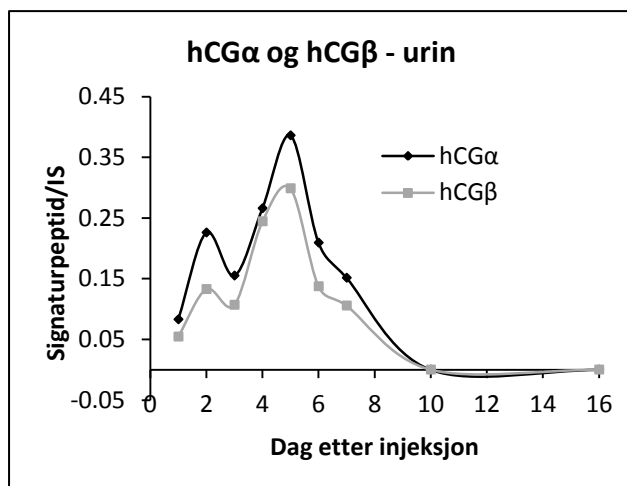
Serum: $y = 0,0065x + 0,0875$, $r^2 > 0,999$

Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	240	108
2	179	84
3	159	x
4	100	46
5	71	x
6	30	x
7	23	6
10	5	-8
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 23



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 19

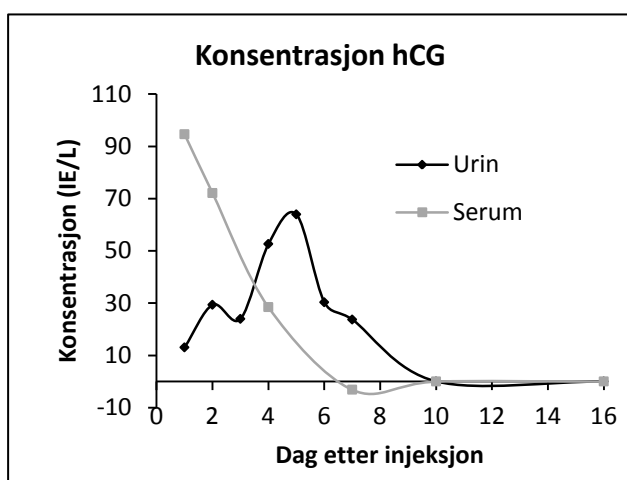
Bemerkninger:

- Urin- og serumprøver for dag 14 ble avlevert på dag 16.
- Ingen isoformer ble detektert.
- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Negativ hCG-konsentrasjon i serum dag 7 skyldes at standardkurven ikke går gjennom origo.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0048x - 0,0081$, $r^2 = 0,997$

Serum: $y = 0,0065x + 0,0875$, $r^2 > 0,999$

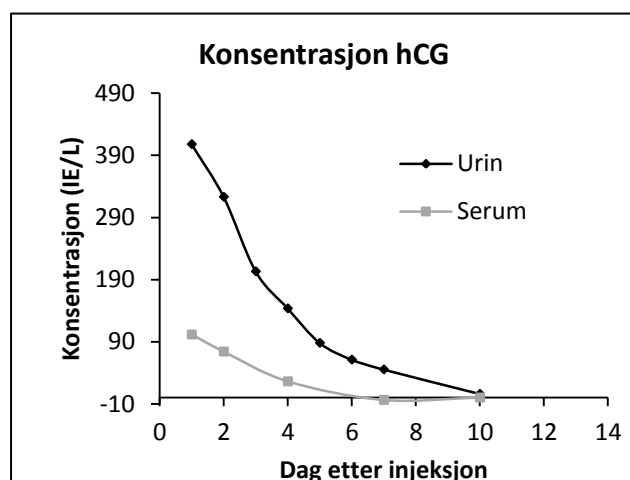
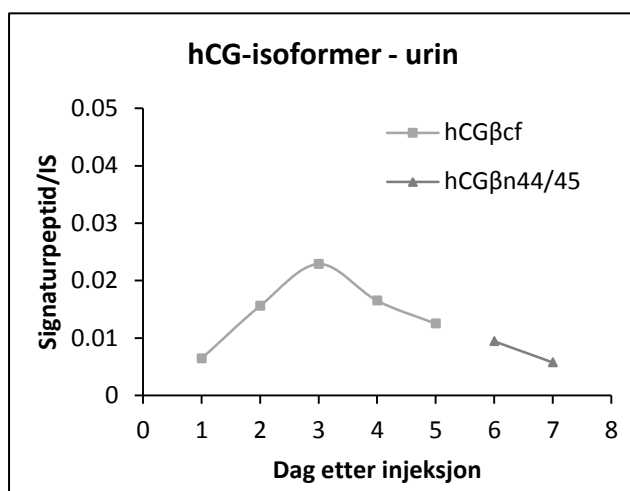
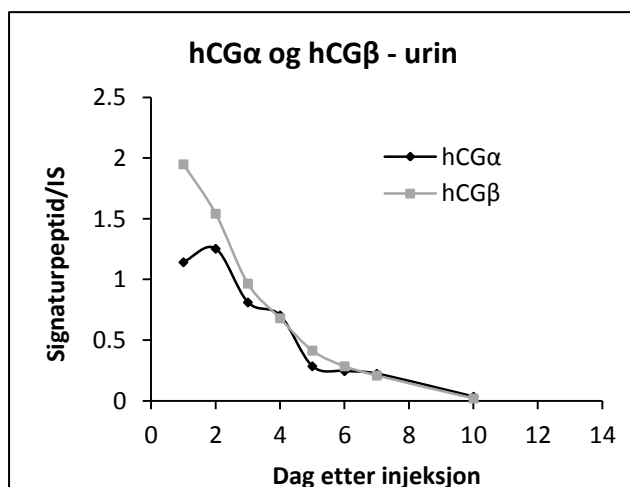


Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	13	95
2	29	72
3	24	x
4	53	28
5	64	x
6	30	x
7	24	-3
10	ID	ID
16	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

Deltaker 24



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 19

Bemerkninger:

- Ikke avgitt urin- og serumprøve for dag 14.
- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Negativ hCG-konsentrasjon i serum dag 7 skyldes at standardkurven ikke går gjennom origo.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0048x - 0,0081$, $r^2 = 0,997$

Serum: $y = 0,0065x + 0,0875$, $r^2 > 0,999$

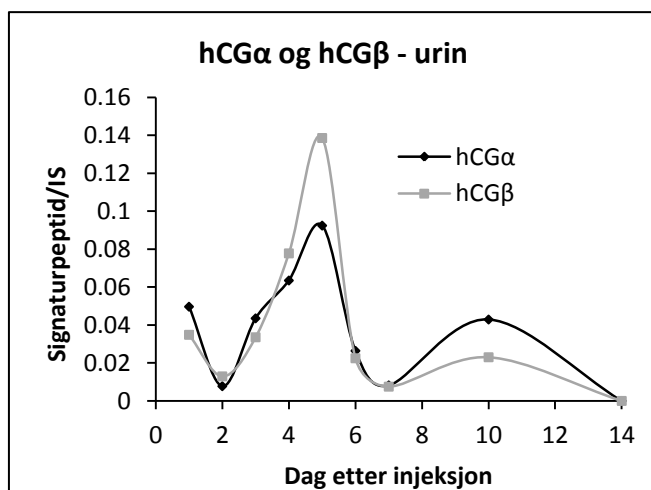
Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	408	101
2	323	74
3	203	x
4	143	26
5	88	x
6	61	x
7	45	-4
10	6	ID
14	-	-

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign

- = Ikke avgitt prøve

Deltaker 25



Deltakerinfo:

Preparat: Ovitrelle®

Alder: 29

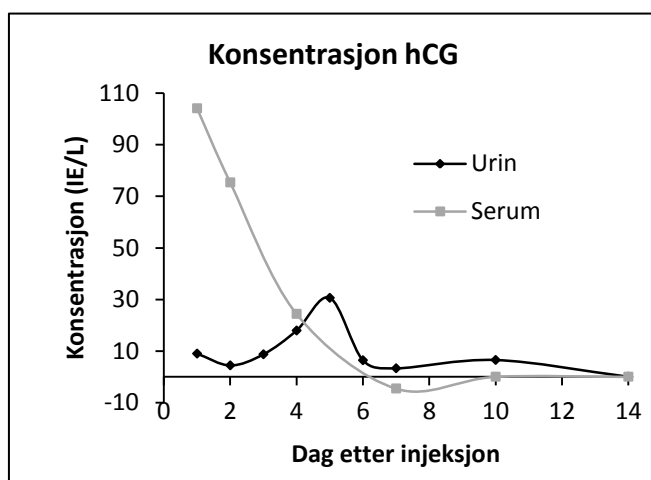
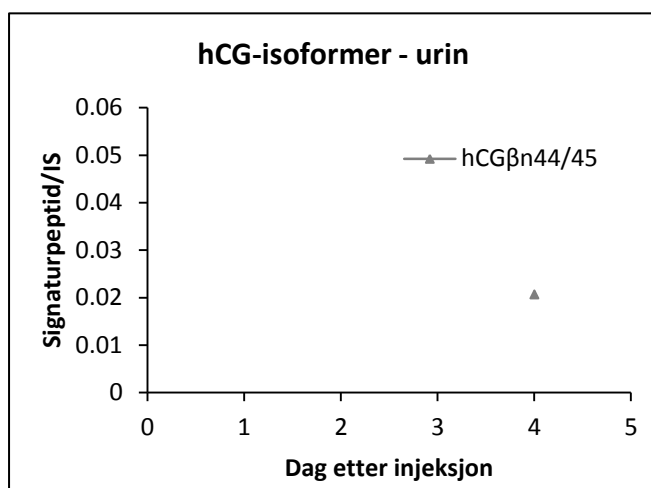
Bemerkninger:

- Standardkurve-serum: 750 IE/L er utelatt grunnet avvikende punkt.
- Negativ hCG-konsentrasjon i serum dag 7 skyldes at standardkurven ikke går gjennom origo.

Standardkurver:

Urin: $y = 0,0048x - 0,0081$, $r^2 = 0,997$

Serum: $y = 0,0065x + 0,0875$, $r^2 > 0,999$



Konsentrasjon hCG (IE/L)		
Dag	Urin	Serum
0	ID	ID
1	9	104
2	4	75
3	9	x
4	18	24
5	31	x
6	6	x
7	3	-5
10	6	ID
14	ID	ID

ID = hCG ikke detektert

x = Prøvetaking ikke inkludert i studiedesign